

Załącznik nr 2
Autoreferat w języku polskim

**Modyfikacja i charakterystyka cienkich warstw
złota i biologicznych struktur powierzchniowych
do celów aplikacyjnych z zastosowaniem technik
bezznacznikowych**

Autoreferat
Tomasz Kobiela

1. Imię i nazwisko

Tomasz Kobiela

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2.1. Magister inżynier

12.04.1995, Warszawa, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej
Tytuł pracy: *Badania nad praktycznym wykorzystaniem enzymatycznych metod biotransformacji tłuszczów*
Promotor: Dr inż. Jacek Arct

2.2. Doktor nauk chemicznych

20.10.2003, Warszawa, Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk
Tytuł pracy: *Zastosowanie mikroskopii sił atomowych (AFM) do badania zjawisk powierzchniowych w procesie tworzenia amalgamatu złota*
Promotor: Prof. Dr. hab. Ryszard Duś

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

05.1995- 12.2003	Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk; Zakład Dynamiki Chemicznej; pozycja: asystent
02.2004- 06.2007	Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk; Zespół Fizyki Biologicznej; adiunkt (od 01.09.2005 do 30.06.2007 - stypendysta Fundacji Alexandra von Humboldt'a , Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Bonn, Niemcy)
od 11.2007	Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny, Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków; pozycja: adiunkt mianowany (11.2008 -12.2017 Z-ca Dyrektora Instytutu Biotechnologii)

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

Osiągnięciem naukowym w rozumieniu art.16 ust.2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. jest jednotematyczny cykl publikacji pt.

Modyfikacja i charakterystyka cienkich warstw złota i biologicznych struktur powierzchniowych do celów aplikacyjnych z zastosowaniem technik bezznacznikowych

Na cykl ten składa się **11 artykułów** z bazy Journal Citation Reports (JCR) [H1-H11]. Ich łączny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) wynosi **30,471**. Wybrane artykuły opublikowano w latach 2005-2017. W **7 artykułach** pełniłem funkcję osoby (*ang. corresponding author*) odpowiedzialnej za przygotowanie ostatecznej wersji pracy do wysłania, kontakt z edytorem, recenzentami oraz przygotowaniem odpowiedzi na recenzje.

5. Publikacje naukowe będące podstawą osiągnięcia naukowego

- [H1] **Characterization of bimetallic systems with UPS and PAX: gold on platinum and palladium surfaces**, M. Moors, T. Kobiela, A. Krupski, C. Becker, K. Wandelt, *Acta Physica Polonica A*, 114 (2008) 77
IF₂₀₀₈= 0,321; CI= 0
Mój udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentów, nadzorze i współuczestniczeniu we wszystkich pomiarach, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz współredagowaniu odpowiedzi dla recenzentów.
Mój wkład określam na **60%**
- [H2] **Characterization of bimetallic Au-Pt (111) surfaces**, T. Kobiela, M. Moors, W. Linhart, I. Cebula, A. Krupski, C. Becker' K. Wandelt, *Thin Solid Films*, 518 (2010) 3650
IF₂₀₁₀= 1,909; CI= 5
Mój udział dotyczył opracowania koncepcji pracy, przygotowania planu eksperymentów, opracowania otrzymanych wyników, nadzorze i współuczestniczeniu we wszystkich pomiarach, opracowania otrzymanych wyników, przygotowania manuskryptu oraz współredagowania odpowiedzi dla recenzentów.
Mój wkład określam na **60%**
- [H3] **Structure Determination of Au on Pt (111) Surface: LEED, STM and DFT Study**, K. Krupski, M. Moors, P. Jóźwik, T. Kobiela, A. Krupski, *Materials*, 8 (2015) 2935
IF₂₀₁₅= 2,651; CI= 14
Moja rola w tej publikacji polegała na przygotowaniu planu eksperymentów, wykonaniu części pomiarów i opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu części manuskryptu oraz współredagowaniu odpowiedzi dla recenzentów.
Mój wkład określam na **30%**
- [H4] **Fabrication of Au nanostructures in the process of amalgam formation followed by Au-Hg alloy thermal decomposition**, T. Kobiela ✉, Z. Kaszukur, R. Duś, *Thin Solid Films* 478, (2005), 152
IF₂₀₀₅= 1,569; CI= 5
Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentów, wykonaniu większości pomiarów i opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem. Pełniłem funkcję corresponding author.
Mój wkład określam na **85%**

- [H5] **Gold electrodes with rough surfaces. The Golden Hedgehog Project, M. Mierzwa, W. Fabianowski, Ł. Górski, P. Smektała, T. Kobiela** ✉, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 735 (2014) 63
IF₂₀₁₄= 2,729; CI= 2
Mój udział polegał na stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentów, wykonaniu pomiarów AFM i opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem. Pełniłem funkcję corresponding author.
Mój wkład określam na 60%
- [H6] **Relation Between Surface Properties of Thin Composite Films and Osteoblasts Behaviour In Vitro, B. Polak, R. Olkowski, T. Kobiela, M. Lewandowska-Szumieł, W. Fabianowski, Journal of Physics: Condensed Matters 19 (2007) 285216**
IF₂₀₀₇= 1,886; CI= 0
Mój udział w tej pracy polegał na koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentów, wykonaniu pomiarów AFM i opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz współredagowaniu odpowiedzi dla recenzentów.
Mój wkład określam na 55%
- [H7] **The effect of polymeric membrane surface on HaCaT cell properties, T. Kobiela** ✉, M. Milner-Krawczyk, E. Łukowska, P. Dobrzyński, M. Pastusiak, A. Smoła-Dmochowska, J. Lukes, K. Bobecka-Wesołowska, A. Chwojnowski, *Micron*, 101 (2017) 162
IF₂₀₁₇= 1,98; CI= 0
Mój udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentów, wykonaniu pomiarów AFM i współuczestniczeniu w innych pomiarach, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem. Pełniłem funkcję corresponding author.
Mój wkład określam na 55%
- [H8] **The influence of surfactants and hydrolyzed proteins on keratinocytes viability and elasticity, T. Kobiela** ✉, K. Lelen, M. Stepulak, M. Lekka, M. Malejczyk, J. Arct, S. Majewski, *Skin Research and Technology*, 19 (2013) e200
IF₂₀₁₃= 1,536; CI= 6
Mój udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentów, wykonaniu pomiarów AFM i współuczestniczeniu w innych pomiarach, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem. Pełniłem funkcję corresponding author.
Mój wkład określam na 55%

- [H9] **The effect of delphinidin on the mechanical properties of keratinocytes exposed to UVB radiation, A. Sobiepanek, M. Milner-Krawczyk, K. Bobecka-Wesołowska, T. Kobiela ✉, Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 164 (2016) 264**

IF₂₀₁₆= 2,673; CI= 2

Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentów, nadzorze i współuczestniczeniu we wszystkich pomiarach, przygotowaniu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem. Pełniłem funkcję corresponding author.

Mój wkład określam na **60%**

- [H10] **Reaction pathway and free energy profile determined for specific recognition of oligosaccharide moiety of carboxypeptidase, E. Senkara-Barwijuk, T. Kobiela ✉, K. Lebed, M. Lekka, Biosensors and Bioelectronics, 36 (2012) 103**

IF₂₀₁₂= 5,437; CI= 4

Mój udział w tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentów i współuczestniczeniu w pomiarach, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem. Pełniłem funkcję corresponding author.

Mój wkład określam na **40%**

- [H11] **AFM and QCM-D as tools for the distinction of melanoma cells with a different metastatic potential, A. Sobiepanek, M. Milner-Krawczyk, M. Lekka, T. Kobiela ✉, Biosensors and Bioelectronics, 93 (2017) 274**

IF₂₀₁₇= 7,78; CI= 7

Mój udział w tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy i zadań badawczych, przygotowaniu planu eksperymentów, nadzorze i współuczestniczeniu we wszystkich pomiarach, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem. Pełniłem funkcję corresponding author.

Mój wkład określam na **60%**

Wszystkie szczegóły dotyczące sposobu prowadzenia badań oraz otrzymanych wyników zawarte są w załączonych artykułach. Przedstawiona kompilacja stanowi ich zwarte omówienie. Kolejność omawiania otrzymanych wyników nie jest zgodna z kolejnością ich opublikowania. Publikacje, stanowiące osiągnięcie naukowe, oznaczono pogrubionymi symbolami, na przykład [H1].

Omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników.

Spis treści

1. Wprowadzenie.....	6
1.1. Zastosowanie cienkich warstw złota i biologicznych struktur powierzchniowych do opracowania bezznacznikowych systemów detekcji	6
1.1.1. Systemy detekcji wymagające znakowana analitu.....	7
1.1.2. Bezznacznikowe systemy detekcji	7
1.1.2.1. Przetworniki stosowane w technologii mikrowagi kwarcowej	8
1.1.2.2. Przetworniki stosowane w technice mikroskopii sił atomowych	9
2. Wyniki przeprowadzonych badań i dyskusja.....	10
2.1. Badania zastosowania cienkich warstw złota do celów przemysłowych	10
2.1.1. Opracowanie metody modyfikacji chemicznej powierzchni metalicznych ..	10
2.1.2. Opracowanie metody otrzymywania warstw złota o ściśle określonej geometrii na podłożach niemetalicznych	12
2.2. Zastosowanie cienkich warstw złota w przetwornikach stosowanych do badań Biologicznych	14
2.2.1. Badanie wpływu modyfikacji powierzchni warstw polimerowych na właściwości żywych komórek	15
2.2.2. Opracowanie biosensorów do badania celów biologicznych technikami AFM i QCM na bazie żywych komórek	19
2.2.2.1. Wybór komórek skóry stanowiących model badawczy	20
2.2.3. Diagnostyka i ocena efektywności działania substancji ochronnych przeciwko uszkodzeniom skóry czynnikami chemicznymi i fizycznymi	21
2.2.3.1. Diagnostyka reakcji kontaktowego zapalenie skóry <i>in vitro</i>	21
2.2.3.2. Ocena efektywności działania substancji ochronnych przeciwko uszkodzeniom skóry promieniowaniem UVB	24
2.2.4. Badanie możliwości zastosowania metod AFM i QCM do diagnostyki progresji raka skóry (czerniaka)	26
2.2.4.1. Opracowanie biosensora na bazie oddziaływania lektyna/specyficzne glikany nowotworowe z zastosowaniem karboksypeptydazy Y jako modelowego białka	29
2.2.4.2. Opracowanie biosensora komórkowego na bazie oddziaływania lektyna/specyficzne glikany nowotworowe dla linii komórkowych czerniaka	33
3. Podsumowanie	37
4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	38
5. Bibliografia.....	39

1. Wprowadzenie

Celem badań stanowiących cykl publikacji było opracowanie bezznacznikowego systemu detekcyjnego składającego się z cienkich warstw złota i biologicznych struktur powierzchniowych do badań aplikacyjnych w przemyśle i medycynie. Możliwość badania żywych komórek ma kluczowe znaczenie dla poznania biologii komórki, tkanki i narządu. Pojawiają się rosnące wymagania w zakresie nanotechnologii, które umożliwiają badania wpływu czynników zewnętrznych na fizjologiczne i patologiczne właściwości komórek *in vitro*. Wymagało to rozwiązania następujących problemów:

- optymalizacji zastosowania metod bezznacznikowych (AFM i QCM) do badania oddziaływań analitów z biologicznymi strukturami powierzchniowymi stosowanymi jako ligandy
- opracowania metod modyfikacji (chemicznej i fizycznej) cienkich warstw złota naparowanych na powierzchnie metaliczne i niemetaliczne
- opracowania metod immobilizacji żywych komórek na modyfikowanych podłożach, a następnie dobór i charakterystyka specyficznych markerów powierzchniowych

1.1. Zastosowanie cienkich warstw złota i biologicznych struktur powierzchniowych do opracowania bezznacznikowych systemów detekcji

Systemy detekcji składają się z struktur biologicznych identyfikujących specyficznie molekuły analitu oraz z układu przetwornika generującego sygnał przy niskich stężeniach analitu (Carrara 2011). Biosensor różni się od sensora chemicznego tym, że wykorzystuje struktury biologiczne w celu rozpoznania badanego związku poprzez przekazywanie specyficznego sygnału. Opracowano wiele rodzajów biosensorów, które działają wykorzystując powinowactwo występujące pomiędzy unieruchomionym na powierzchni ligandem, a badaną cząsteczką – analitem.

Rozwój nanotechnologii spowodował ogromne zainteresowanie preparatyką i charakterystyką cienkich warstw złota o ściśle określonych parametrach osadzonych na podłożu metalicznym i niemetalicznym. Struktury takie posiadają unikalne właściwości fizyczne i są używane do tworzenia nowych materiałów wykorzystywanych w katalizie, fotowoltaice oraz budowie biosensorów, których konstrukcja wymaga nanoszenia struktur biologicznych na różnorodne powierzchnie bez utraty ich właściwości. Sprawia to, że niezbędna jest selekcja właściwych oddziaływań, które można zmierzyć za pomocą technik stosowanych w fizykochemii powierzchni ciała stałego, przy zastosowaniu specjalnych

procedur umożliwiających badanie obiektów biologicznych. Uzyskanie takiego celu wymaga modyfikacji powierzchni przetwornika.

1.1.1. Systemy detekcji wymagające znakowania analitu

Większość analiz prowadzonych przy użyciu biosensorów wymaga, żeby oznaczany analit posiadał specyficzny znacznik, który powinien w prosty i trwały sposób łączyć się z analitem, nie zmieniać jego właściwości biologicznych i pozwalać na wykrycie utworzonego kompleksu znanymi metodami analitycznymi. Techniki takie umożliwiają ilościowe oznaczanie analitu. Do DNA, białek lub struktur komórkowych wykorzystuje się dostępne komercyjnie znaczniki fluorescencyjne. Pomiar intensywności fluorescencji umożliwia mapowanie struktury badanej molekuly oraz jej ilościową ocenę. W podobny sposób wykorzystuje się znakowanie analitu specyficznymi przeciwciałami, które mogą zainicjować reakcję enzymatyczną, fluorescencyjną lub chemiluminescencyjną.

Metody znakowania pozwalają na zwiększenie selektywności biosensora, ale należą do stosunkowo kosztownych, co ogranicza możliwość ich stosowania, zwłaszcza w badaniach przesiewowych. Ponadto przyłączenie znacznika może istotnie zmieniać właściwości badanej cząsteczki przez indukcję nieprawidłowej konformacji lub przez blokowanie jej miejsca aktywnego, co zmienia zdolność wiązania i tworzenia specyficznych kompleksów analit-ligand. Substancje wykorzystywane jako znaczniki mogą przyłączać się do innych cząsteczek niż docelowa, a w przypadku stosowania żywych komórek mogą zaburzać ich metabolizm. Procedury przyłączania znacznika są również czasochłonne, ponieważ stanowią dodatkowy etap przygotowania próbki.

1.1.2. Bezznacznikowe systemy detekcji

W przemyśle farmaceutycznym wykonuje się miliony testów w czasie kilku miesięcy, w celu ustalenia specyficzności różnych substancji wchodzących w reakcje z badanym białkiem docelowym, rozpoznanym jako patogenne. Czynniki, które bezpośrednio wpływają na szybkość i koszt wprowadzenia nowego leku na rynek, to przede wszystkim wieloetapowość i czas wykonywanych testów, zużycie odczynników oraz powtarzalność otrzymywanych wyników. Obecnie istnieje wiele technik, które pozwalają na bezpośrednie wykrycie analitów bez ich wcześniejszego znakowania. Stosuje się metody polegające na pomiarze pewnych właściwości fizycznych związku chemicznego, cząsteczki DNA, peptydu, białka, wirusa lub

całej komórki (Cooper 2009). Wszystkie biochemiczne molekuly i komórki mają określoną masę, objętość oraz charakteryzują się lepkością i sprężystością. Te właściwości mogą być wykorzystane do wykrycia obecności analitu za pomocą odpowiedniego czujnika. Jednym z elementów budowy biosensorów typu „label free” jest przetwornik, który jest odpowiedzialny za przekształcenie jednej z wymienionych właściwości fizycznych (np. masa substancji osadzonej na aktywnej powierzchni czujnika) na mierzalny sygnał, który może być oceniony za pomocą odpowiedniej metody. W tym celu można zastosować metody badania powierzchni ciał stałych takie jak mikrowaga kwarcowa (*Quartz-Crystal Microbalance*, QCM) i mikroskopia sił atomowych (*Atomic Force Microscopy* AFM).

1.1.2.1. Przetworniki stosowane w technologii mikrowagi kwarcowej (QCM-D).

Biosensory oparte na technologii mikrowagi kwarcowej są powszechnie stosowane do badania molekularnych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami biologicznymi jak DNA, białka czy lipidy. Mikrowaga kwarcowa jest techniką bardzo czułą, w związku z tym dedykowana jest do badania bardzo małych zmian masy (rzędu nanogramów). Przetwornik QCM składa się z piezoelektrycznego kryształu, do którego przyłączone są dwie złote elektrody. Jego powierzchnia może być wykonana z różnych materiałów, jednak jednymi z najczęściej stosowane są powierzchnie złote lub pokryte dodatkową warstwą biokompatybilną dla komórek (polistyren, SiO₂). Opracowanie nowych metod modyfikacji i funkcjonalizacji powierzchni przetwornika oraz immobilizacji ligandu jest kluczowe dla zaprojektowania czułego, selektywnego, szybkiego i stosunkowo niedrogiego systemu detekcyjnego. W wyniku przyłożonego zmiennego napięcia, przetwornik wprawiany jest w drgania, których częstotliwość zależna jest od związanej masy. W miarę wiązania cząsteczek do powierzchni przetwornika, jego częstotliwość proporcjonalnie się zmniejsza. Jeżeli tworzona warstwa jest odpowiednio sztywna, cienka i równomiernie rozłożona na sensorze, wtedy masę można obliczyć ze wzoru Sauerbrey'a:

$$\Delta f = -\frac{\Delta m}{nC}$$

gdzie:

Δf – zmiana częstotliwości drgań sensora

Δm – zmiana masy zaadsorbowanej na powierzchni sensora

n – numer nadtonu ($n = 1, 2, 3 \dots$)

C – stała czułości (dla 5 MHz rezonatora kwarcowego drgającego z częstotliwością

fundamentalną ($n=1$) $C = 17,7 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}\text{Hz}^{-1}$)

Powyższe równanie nie jest spełnione, kiedy warstwa tworzona na powierzchni sensora nie jest sztywna. Ponadto, wiązanie cząsteczek wody powoduje dodatkowy spadek częstotliwości, prowadząc do detekcji większej masy niż jest faktycznie zaadsorbowana na sensorze.

W celu uzyskania dodatkowych informacji o właściwościach tworzącej się warstwy, stosuje się metodę QCM z funkcją śledzenia dyssypacji (rozpraszania) energii (QCM-D). Spadek dyssypacji świadczy o powstawaniu uporządkowanej warstwy na powierzchni sensora. Stosowanie mikrowagi kwarcowej z funkcją śledzenia dyssypacji energii pozwala więc na jednoczesne mierzenie dwóch osobnych parametrów charakteryzujących oddziaływanie ligand-analit. Pomiar spadku częstotliwości (Δf) dostarcza informacji o masie zaadsorbowanej na sensorze, natomiast zmiany w dyssypacji energii (ΔD) mówią o lepkośćprężystych właściwościach tworzonej warstwy.

1.1.2.2. Przetworniki stosowane w technice mikroskopii sił atomowych (AFM)

Przetwornikiem sygnału może być układ mikromechaniczny, w którym mierzoną odpowiedzią jest wychylenie dźwigni sondy mikroskopu sił atomowych (AFM). AFM jest obecnie jedną z niewielu metod eksperymentalnych umożliwiającą badanie *in vitro* zarówno integralnych żywych komórek jak i struktur subkomórkowych oraz pojedynczych biomolekuł w czasie rzeczywistym, w warunkach fizjologicznych, z rozdzielczością atomową. AFM należy do rodziny mikroskopów skaningowych bliskiego pola (ang. *Scanning probe microscopy*, SPM). Działanie mikroskopu sił atomowych polega na pomiarze oddziaływania zachodzącego pomiędzy badaną powierzchnią a submikrometrowej wielkości ostrzem, umieszczonym na swobodnym końcu płaskiej, elastycznej dźwigni. Szczegółowy opis instrumentalny mikroskopu AFM oraz podstaw teoretycznych tej techniki jest zamieszczony w pracach: (Binning 1986, Morris 1999). Ostrze sondy AFM jest również bardzo wrażliwym urządzeniem stosowanym do mierzenia i charakteryzowania lokalnie działających sił. Jedno z głównych obecnie zastosowań AFM polega na wykorzystaniu tej techniki do mierzenia oddziaływań pomiędzy ostrzem a badaną powierzchnią w funkcji przyłożonej siły. Zebranie danych do wykonania krzywej siła-odległość polega na precyzyjnym przesuwaniu próbki umieszczonej na skanerze w kierunku ostrza, a następnie na odsuwaniu próbki od ostrza. Ze względu na technikę pomiaru oraz na rodzaj przeważających oddziaływań, krzywą siła-odległość dzielimy na krzywą powstałą w trakcie zbliżania sondy AFM do powierzchni i krzywą powstałą podczas

jej oddalania. Kształt krzywej siła-odległość powstałej podczas zbliżania do powierzchni niesie informację o mechanicznych właściwościach próbki, takich jak np. elastyczność. Dlatego, w ostatnich latach AFM stała się powszechnie stosowaną metodą w badaniach mechanicznych właściwości komórek. Druga część krzywej siła-odległość powstająca podczas oddalania powierzchni od ostrza niesie ze sobą głównie informację o oddziaływaniach adhezyjnych, wśród których można wyróżnić oddziaływania o charakterze kowalencyjnym oraz wytworzenie wiązań niekowalencyjnych w układzie ligand-analit.

2. Wyniki przeprowadzonych badań i dyskusja

2.1. Badania zastosowania cienkich warstw złota do celów przemysłowych

2.1.1. Opracowanie metody modyfikacji chemicznej powierzchni metalicznych (stypendium Fundacji Aleksandra von Humboldt 'a) [H1-H3]

Badania cienkich warstw złota naniesionych na powierzchnie metaliczne są przedmiotem zainteresowania, ponieważ układy bimetaliczne, stanowią nie tylko przykłady układów modelowych dla katalizy heterogenicznej, lecz również odgrywają istotną rolę w pojawiających się nowych technologiach związanych z ochroną środowiska i energetyką (ogniwa paliwowe), a także w budowie efektywnych biosensorów. Cienkie, ciągłe warstwy złota, z racji swoich właściwości takich jak mała rezystancja właściwa ($2,4 \mu\Omega/\text{cm}$), tolerancja na dużą gęstość prądu, odporność na elektromigrację i ogólna bierność chemiczna znajdują rozległe zastosowanie w przemyśle, elektronice, medycynie, badaniu procesów powierzchniowych i wielu innych dziedzinach.

Złoto jest odporne na oddziaływania z gazami stanowiącymi główne składniki powietrza. Właśnie z powodu chemicznej inertności, złoto było uznawane za katalitycznie nieaktywny metal. Jednakże wyżej wymienione właściwości dotyczą ciągłych warstw złota, złożonych z ziaren o średnicy większej od 10nm. Wyniki prowadzonych badań wykazały, że nieciągłe warstwy złota zbudowane z klasterów w wysokim stopniu rozdrobnienia osadzone na powierzchniach metalicznych, wykazują szczególną aktywność katalityczną dla szeregu reakcji (np. utleniania CO) również w niskich temperaturach. Może to prowadzić do modyfikacji chemicznej powierzchni metalicznej.

Bazując na powyższym założeniu przygotowałem projekt: „*Characterization and adsorption properties of Au alloy surfaces*“, za który uzyskałem prestiżowe stypendium

naukowe przyznane przez Fundację **Aleksandra von Humboldt** 'a na prowadzenie badań naukowych na Uniwersytecie w Bonn w grupie Profesora Klausa Wandelta. Głównym celem realizowanego projektu była charakterystyka cienkich warstw złota osadzonych na powierzchniach kryształów platyny i palladu [H1-H3]. Reaktywność katalityczna zależy od warunków przygotowania i otrzymanej wielkości nanostruktur złota. Zastosowane w badaniach podłoża różnią się istotnie pod względem reaktywności chemicznej, np. pallad jako katalizator umożliwia częściowe uwodornienie butadienu do 1-butenu, w przeciwieństwie do platyny, która pozwala na odwodornienie butadienu. Połączenie różnych podłoży, posiadających odmienne właściwości chemiczne z mniej aktywnym chemicznie złotem może prowadzić do powstania nowych bimetalicznych katalizatorów z interesującymi właściwościami chemicznymi.

W pierwszym etapie sprawdziłem stabilność termiczną ultracienkich warstw złota osadzonych na powierzchniach kryształów metali szlachetnych z użyciem spektroskopii fotoelektronów w zakresie nadfioletu (*ang.* UPS) oraz fotoemisji zaadsorbowanego Xenonu (*ang.* PAX). Wykazałem przydatność unikatowej metody doświadczalnej PAX jako bardzo dobrej techniki do charakterystyki układów bimetalicznych. Powierzchnia warstw złota o grubości trzech monowarstw przygotowana w temperaturze 150K na wszystkich podłożach ulegała uporządkowaniu w procesie wygrzewania do temperatury pokojowej, jednakże w przypadku palladu efekt ten był widoczny tylko w zewnętrznej warstwie. Dalszy proces wygrzewania układów Au-Pd i Au-Pt do temperatur odpowiednio 450K oraz 750K zapoczątkował proces formowania stopów powierzchniowych, które obserwowane były do temperatury 650K dla Au-Pd oraz 950K dla Au-Pt. Całkowity proces desorpcji złota na palladzie i platynie widoczny był dla temperatur odpowiednio 1050 oraz 1150K. [H3]

Opracowałem technologiczną metodę otrzymywania stopu powierzchniowego Au-Pt [H2]. Za pomocą metod PAX i skaningowej mikroskopii tunelowej (STM) potwierdziłem mechanizm tworzenia dobrze zdefiniowanego stopu Au-Pt. Otrzymany stop powierzchniowy wykazywał takie same właściwości katalityczne charakterystyczne dla platyny, natomiast w przeciwieństwie do Pt, na powierzchni stopu nie stwierdzono adsorpcji tlenku węgla, co ma istotne znaczenie praktyczne (zapobieganie zatruciu powierzchni katalizatora).

2.1.2. Opracowanie metody otrzymywania warstw złota o ściśle określonej geometrii na podłożach niemetalicznych [H4, H5]

Konwencjonalne metody otrzymywania warstw Au o ściśle określonej geometrii oparte na technologii „top-down” wykorzystywane są w przemyśle elektronicznym do otrzymywania układów scalonych. Struktury takie mogą być otrzymane po poddaniu warstw Au naniesionych na płytki krzemowe (napylanie próżniowe, rozpylanie katodowe) wyrafinowanym procesom fotolitografii oraz trawienia (chemicznego, wiązką elektronową, plazmowego).

Ostatnio, coraz częściej nieciągłe warstwy złota składające się z uporządkowanych krystalitów otrzymywane są poprzez próżniowe naporowanie Au na podłoże stałe poprzez odpowiednią maskę stanowiącą swoiste sito o drobnych oczkach. Prowadzone są również liczne prace badawcze nad procesem bezpośredniego, selektywnego osadzania pól kontaktowych (ang. *Dip-Pen Nanolithography*). Jednakże tego typu technologie wymagają zastosowania zaawansowanej robotyki i są bardzo kosztowne.

W związku z wyżej wymienionymi ograniczeniami postanowiłem opracować i zbadać rozwiązanie, które mogłoby być prostsze i tańsze. Na wstępnie zmodyfikowaną powierzchnię niemetaliczną została naporowana ciągła warstwa złota o grubości 50 nm. Następnie, za pomocą reakcji chemicznej cienkich warstw Au z parami Hg dokonałem transformacji ciągłej, cienkiej warstwy złota, w stabilną warstwę nieciągłą zbudowaną z odseparowanych, niekontaktujących się ze sobą klasterów złota [H4]. Aby przekształcić ciągłą, cienką warstwę złota w warstwę nieciągłą należy wykonać pracę związaną z powiększeniem powierzchni. W tym celu wykorzystałem zmianę energii swobodnej układu: „cienka warstwa metalu – podłoże” powstająca w wyniku reakcji chemicznej metalu z cienką warstwę z parami Hg i utworzenia na powierzchni podłoża nowego indywiduum chemicznego – amalgamatu złota. W pierwszej chwili rozkład termiczny tego produktu pozostawi na powierzchni podłoża nieciągłą warstwę wyjściowego metalu. Naturalna tendencja do obniżenia energii swobodnej układu poprzez łączenie się klasterów prowadzi jednak w kierunku rekonstrukcji ciągłej warstwy, poprzez migrację klasterów po powierzchni podłoża. W celu zahamowania tego należy użyć podłoża o heterogenicznej powierzchni, na której wystąpią lokalnie mikroobszary silniej oddziałujące z klasterami metalu od miejsc pozostałych. W tych mikroobszarach podłoża klasterzy metalu zostaną „zakotwiczone”. Jeśli wytworzone zostaną takie mikroobszary na powierzchni podłoża, w których „zakotwiczenie” utrzyma się nawet w podwyższonej temperaturze np. $\sim 500\text{K}$, to uzyskana zostanie stabilna, nieciągła warstwa metalu. Niezwykle mała energia kohezji rtęci sprawia, że amalgamaty złota można utworzyć poprzez kontakt złota

z parami rtęci. Badania przeprowadzone za pomocą mikroskopii sił atomowych wykazały, że stabilne pola kontaktowe Au pozostały na podłożu stałym w miejscach pierwotnych chropowatości, uszkodzeń mechanicznych powierzchni szkła. Ponadto, wykazałem, że stabilne pola kontaktowe Au można otrzymać nie tylko na powierzchni szkła, ale również na powierzchni polimerowej. Zaobserwowany efekt agregacji Au na defektach powierzchniowych stwarza możliwość kontrolowanego otrzymywania zorganizowanych struktur Au. Wymaga to jednak przeprowadzania dalszych badań korelujących morfologię uzyskiwanych klasterów Au ze sposobem modyfikacji struktury powierzchni podłoża. W przypadku otrzymania pozytywnych wyników, na powierzchni stałego podłoża mogłyby być osadzane w kontrolowany sposób pola kontaktowe wykonane z klasterów Au o ściśle określonej geometrii, tworzące wielopolową matrycę kontaktów. Można je wykorzystać do otrzymania wielopolowego sensora wykonanego w kontrolowany sposób z pól kontaktowych Au. Sensory takie mogłyby zostać wykorzystane w badaniach migracji komórek.

Kolejnym, logicznym etapem badawczym było opracowanie metody pozwalającej otrzymać warstwy złota o rozwiniętej powierzchni [H5]. Podobnie jak ma to miejsce w przypadku innych materiałów, zwiększenie powierzchni właściwej złota prowadzi do uzyskania zupełnie nowych właściwości, szczególnie istotnych, gdy rozwinięcie powierzchni odbywa się w skali mikrometrowej lub poniżej jednego mikrometra. Procesy służące otrzymywaniu monowarstw metodą samoorganizacji (ang. *Self Assembly Monolayers*, SAM) na drodze adsorpcji tiolowych pochodnych związków organicznych, porowate elektrody, katalizatory heterogenne, czujniki i biosensory zależą od stopnia rozwinięcia powierzchni złota, definiowanej zwykle jako współczynnik szorstkości, czyli stosunku wielkości powierzchni właściwej do wielkości powierzchni geometrycznej.

Jedną z możliwych metod rozwinięcia warstwy złota jest wykorzystanie właściwości amalgamatów Au. Jeżeli wyjściowa warstwa złota ma grubość poniżej 100 nm, to w wyniku procesu tworzenia amalgamatu złota i jego późniejszego rozkładu termicznego w warunkach próżniowych powstaje warstwa zbudowana z izolowanych wysp Au. Jeżeli warstwa złota wyjściowa ma grubość powyżej 100 nm to tworzy się rozwinięta powierzchnia złota osadzona na litym, ciągłym złotym podłożu. W związku z tym zaprojektowałem i wykonałem dwa typy układów do pomiaru rozbudowania powierzchni złotej poprzez trawienie parami Hg warstw złota o grubości 250 nm naparowanych na płytki szklane. Każdy układ zawierał dwie pary elektrod złotych (pracująca + pomocnicza) i jedną wspólną elektrodę pseudoreferencyjną.

Wykazałem [H5], że w wyniku tworzenia się amalgamatu na powierzchni złota, a następnie jego rozkładu, morfologia próbek ulega wyraźnej zmianie, co widać na obrazach z

AFM, a także na wykresach otrzymanych z pomiarów cyklicznej voltamperometrii (piki reakcji utleniania i redukcji dużo wyraźniejsze, przeniesiony ładunek większy). Morfologia próbek zostaje zachowana po termicznym usunięciu Hg z amalgamatu. Współczynnik szorstkości wyznaczony z pomiarów AFM wzrasta z 1.02 (dla niemodyfikowanej warstwy Au) do 1.12 dla modyfikowanej. Dla pełnej charakterystyki rozwinięcia powierzchni, dla losowo wybranych przekrojów policzyłem odchylenie standardowe wysokości (RMS) w danym regionie. RMS wyznaczony z pomiarów AFM wzrasta z 2,80 nm (dla niemodyfikowanej warstwy Au) do 186,76 nm dla modyfikowanej warstwy Au. W ten sposób rozbudowane warstwy Au można wykorzystać w fotowoltaice. Ogniwa fotowoltaiczne są jedną z intensywniej rozwijanej dziedziny badań pozwalającej na pozyskanie dostępnej „zielonej” energii (Helgesen 2010). Duże oczekiwania są związane z cienkimi warstwami fotoaktywnymi osadzonymi na elastycznych podłożach (Graetzel 2012) oraz na wykorzystaniu warstwy zbierającej światło i przewodzącej prąd elektryczny – czyli warstwy złota o wysoce rozwiniętej powierzchni (Jung 2010). Podobne zjawisko – podwyższenie wydajności kwantowej generowania prądu poprzez zastosowanie elektrod o rozwiniętej powierzchni obserwowano też dla innych elektrod jak warstwa TiO_2 na przewodzącej warstwie ITO (ang. *Indium-Tin Oxide*). Można oczekiwać, że przyszłe fotoogniwa będą otrzymywane metodą zadrukowania elastycznych folii z naniesioną warstwą złota lub innego przewodnika o silnie rozwiniętej teksturze farbami zawierającymi mieszaniny fotoczułych barwników.

2.2. Zastosowanie cienkich warstw złota w przetwornikach stosowanych do badań biologicznych

Ostatnie dekady przyniosły rozwój mikrotechnik stosujących złoto w wielu dziedzinach badań biologicznych, zwłaszcza dotyczących kontroli wzrostu i migracji komórek ssących. Opracowano układy pozwalające na uzyskanie stabilnych hodowli różnego typu komórek na przykład na powierzchni cienkich warstw złota pokrytych hiperrozgałęzionymi polimerowymi łańcuchami w celu badań metodami mikroskopii fluorescencyjnej (Amirpour 2001) czy na modyfikowanej powierzchni pokrytych złotem płytek stosowanych w technice spektroskopii plazmonów powierzchniowych. Możliwość hodowli komórek na modyfikowanych powierzchniach warstw złota jest również powszechnie wykorzystywana w systemach mikroprzepływowych (Rosser 2015).

Wszystkie żywe organizmy muszą wytrzymywać, rozpoznawać i reagować z fizycznymi siłami środowiska. U człowieka szkielet służy przeciwdziałaniu siły grawitacji, podczas gdy skóra stanowi barierę umożliwiającą fizyczną interakcję ze środowiskiem oraz

ochronę przed infekcjami przez patogeny. Ostatnie dekady pozwoliły na rozwój badań dotyczących roli rozpoznawania i generacji sił fizycznych na rozwój, fizjologię i procesy chorobowe na poziomie pojedynczej komórki. Prowadzone obecnie biomechaniczne badania łączą teoretyczne i eksperymentalne podejścia w celu uzyskania wiarygodnego opisu mechaniki komórek i jej wpływu na procesy fizjologiczne oraz chorobowe. Uzyskanie jednak pełnego obrazu wymaga interdyscyplinarnych badań z udziałem nowoczesnej biologii i biotechnologii molekularnej, a do tego celu niezbędne są biosensory o odpowiednio modyfikowanych powierzchniach biokompatybilnych z żywymi komórkami. (Moeendarbary 2014).

Dalsze badania dotyczą zastosowania komplementarnych metod AFM/QCM do charakterystyki właściwości mechanicznych i biologicznych ludzkich komórek zlokalizowanych na zmodyfikowanych powierzchniach

2.2.1. Badanie wpływu modyfikacji powierzchni warstw polimerowych na właściwości komórek [H6, H7]

Modyfikacja podłoża pełni ważną rolę w regulacji podstawowych funkcji życiowych ludzkich i zwierzęcych komórek poddawanych procesom inżynierii tkankowej, jak adhezja, proliferacja i różnicowanie. Komórki ludzkie *in vitro* standardowo są hodowane w naczyniach polistyrenowych lub szklanych, rzadziej na powierzchni metali jak tytan, cyrkon czy złoto. W medycynie regeneracyjnej biokompatybilne warstwy polimerowe stosuje się do wytwarzania opatrunków na trudno-gojące się rany oraz jako materiały skóro-zastępcze i transplanty ubytków kostnych. Jedną ze stosowanych procedur *ex vivo* jest wyizolowanie komórek pacjenta i wyhodowanie ich *in vitro* na odpowiednio przygotowanych bioresorbowalnych podłożach, ewentualne dokonanie modyfikacji tych komórek metodami inżynierii genetycznej i ponowne wszczepienie dawcy, co zapobiega odrzutom materiału biologicznego. Konieczne są więc badania różnych rodzajów substratów i odpowiedzi komórkowej na dane podłoże. Szczególną uwagę poświęca się dzisiaj nanometrycznym własnościom, tak aby struktura materiału była biokompatybilna dla normalnej tkanki na poziomie molekularnym.

Pierwszą z tej serii prac [H6] dotyczącą wpływu podłoża na właściwości żywych komórek *in vitro* było badanie właściwości powierzchniowych substratu (topografia, elastyczność oraz skład chemiczny) na żywotność i właściwości ludzkich komórek kostnych (HBDC) w celu uzyskania rusztowania 3D mającego zastosowanie do implantów kostnych.

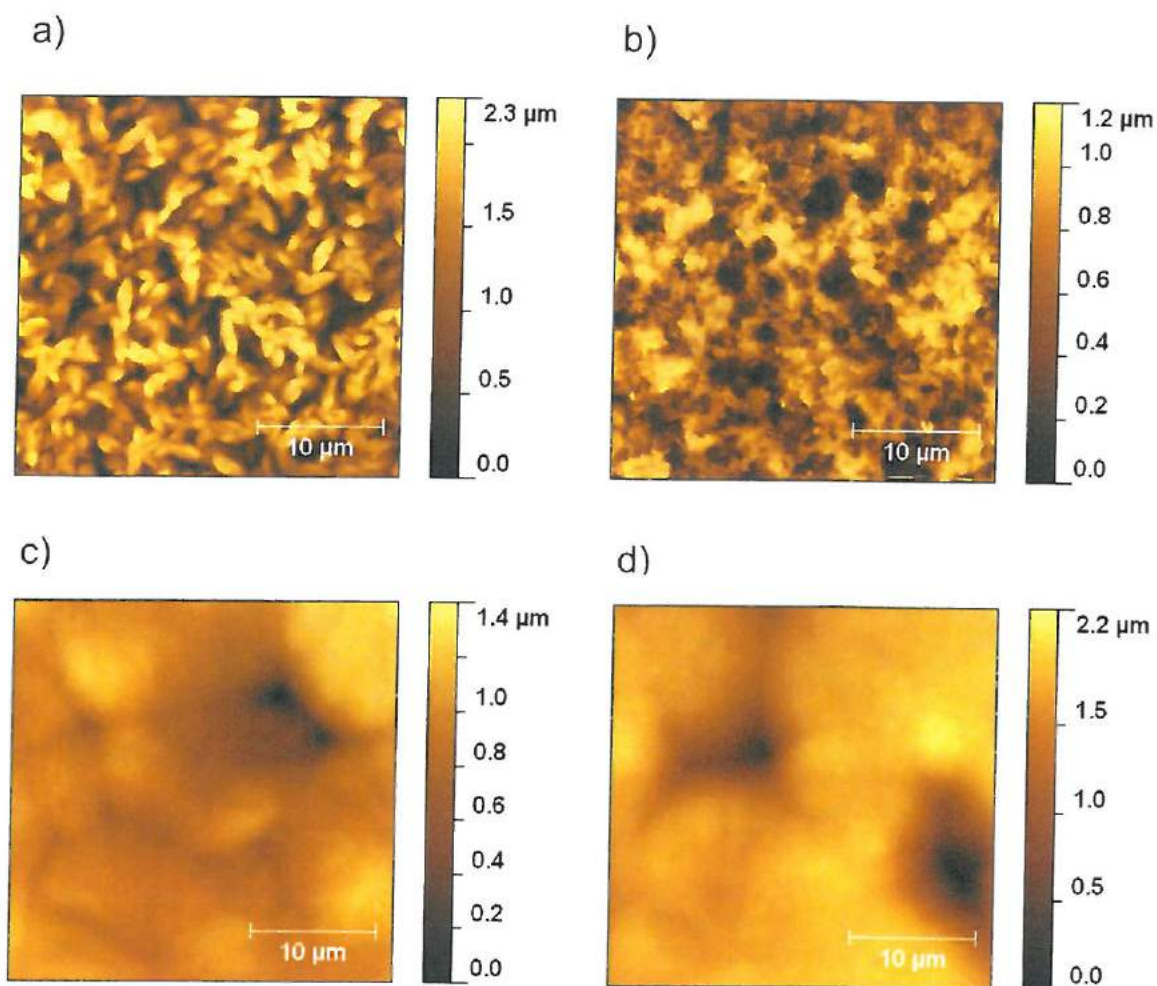
W tym celu opracowano warstwowe, biokompatybilne struktury z krzemu modyfikowanego naniesionymi cienkimi filmami sporządzonymi z poli(akrylowego kwasu)

PAA (warstwa A), jako czynnika zmniejszającego wartość kąta zwilżania (wzrost hydrofilowości) oraz bentonitu (warstwa B) pozwalającego na uzyskanie zróżnicowanej topografii powierzchni. Uzyskane powierzchnie miały różną grubość, elastyczność i topografię. Chemiczny skład substratu oznaczyłem spektroskopią Ramana natomiast sztywność i właściwości powierzchniowe techniką nanoindentacji i metodą AFM. Ludzkie komórki HBDC pozyskiwano z fragmentów kostnych usuwanych chirurgicznie i hodowano w warunkach standardowych na badanych powierzchniach. Analiza uzyskanych wyników pozwoliła na potwierdzenie istotnego wpływu mechanicznych właściwości podłoża, czyli badanych warstw oraz ich powierzchniowej struktury (sztywność, szorstkość) na przeżywalność osteoblastów, podczas gdy zmiana wartości kąta zwilżania była bez wpływu.

Wpływ podłoża na struktury biologiczne może być związany zarówno z właściwościami fizykochemicznymi powierzchni podłoża jak i bezpośrednim, elastycznym oddziaływaniem podłoża ze strukturami komórki. Zatem przygotowanie podłoża jest bardzo ważnym procesem i niezbędne jest zbadanie topografii powierzchni podłoża i jego właściwości mechanicznych przed planowanym naniesieniem struktur biologicznych

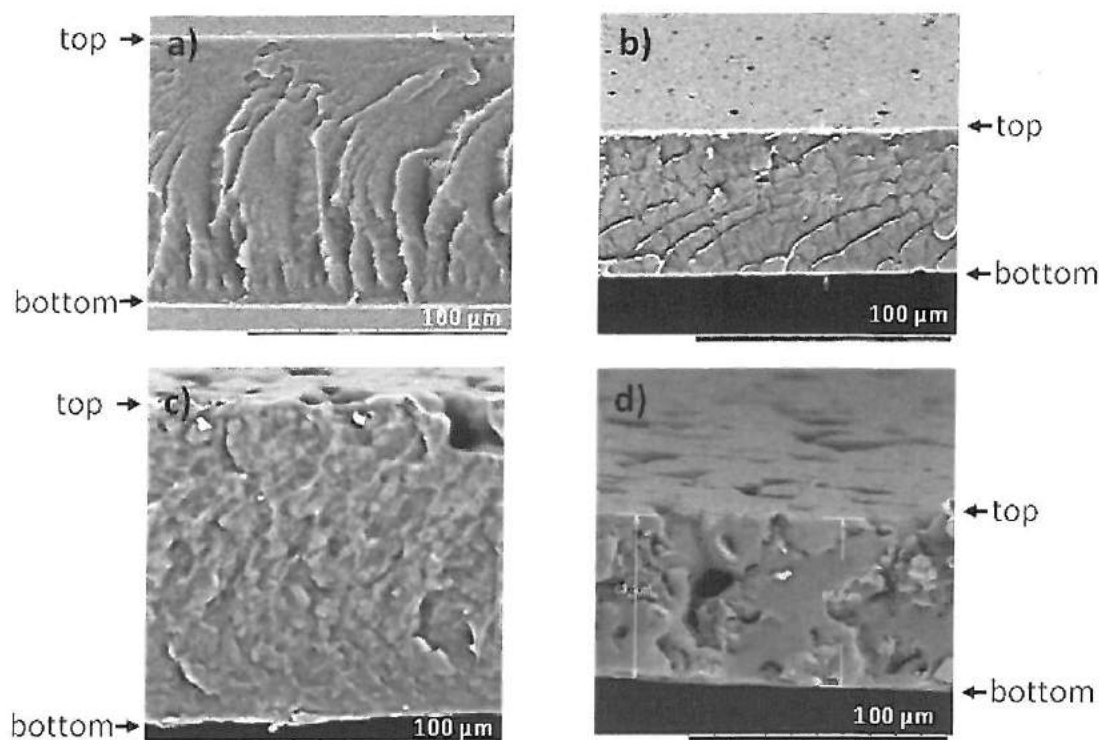
Większość prac dotyczących wpływu sztywności podłoża na właściwości mechaniczne komórek dotyczy podłoży o module elastyczności do 100 kPa. (Discher 2009) Moduł elastyczności większości polimerów jest rzędu ~ 3 to 2000 MPa. Należy zaznaczyć, że moduł elastyczności komórek wyznaczany metodą AFM nie jest wartością bezwzględną i zależy od wielu czynników (Lekka 2012). Opracowałem metodę otrzymywania płaskich membran z terpolimeru glikoidu, L-laktydu i E-kaprolaktonu (PGA-PCL-PLA) i kopolimeru glikoidu i E-kaprolaktonu (PGA-PCL) przy zastosowaniu techniki inwersji faz [H7]. Badane membrany zostały poddane powierzchniowej hydrolizie w środowisku zasadowym, w celu poprawy przeżywalności i proliferacji oraz adhezji komórek. Hydroliza jest pierwszym etapem chemicznej modyfikacji membran. Proces hydrolizy prowadzono zmieniając zarówno czas trawienia jak i stężenie środka hydrolizującego, którym był wodorotlenek sodu. Największy stosunek liczby moli grup COOH na jednostkę powierzchni membran uzyskano stosując 2 M roztwór NaOH przez 2h. Zastosowanie większych stężeń, czy też dłuższego czasu prowadziło do otrzymania gorszej jakościowo membrany.

Przeprowadziłem badania za pomocą AFM wykazując, że topografia membrany PGA-PLA-PCL po hydrolizie ulega istotnej zmianie. Powierzchnia membrany zbudowana z ziaren o wymiarach ($1\mu\text{m}$ – średnica, $0,5\mu\text{m}$ – wysokość) zostaje przekształcona w gąbczastą strukturę (Rys.1)



Rys. 1. Obrazy AFM powierzchni membran polimerowych: a) membrana PGA- PCL-PLA, b) membrana PGA-PCL-PLA po hydrolizie, c) membrana PGA- PCL; d) membrana PGA-PCL po hydrolizie. [H7]

Na przekroju membrany (Rys.2) obserwowanym za pomocą SEM nie są widoczne zmiany (zniszczeniu ulega powierzchniowa warstwa membrany). Jest to typowe dla erozyjnego mechanizmu degradacji.



Ryc. 2. Obrazy SEM powierzchni przełamania membran polimerowych: a) membrana PGA- PCL-PLA, b) membrana PGA- PCL-PLA po hydrolizie, c) membrana PGA- PCL; d) membrana PGA-PCL po hydrolizie. [H7]

Zmianom morfologii membrany towarzyszą zmiany właściwości fizykochemicznych. Do wyznaczenie parametrów szorstkości membran polimerowych zastosowałem procedurę opracowaną dla warstw złota. RMS dla membrany PGA-PLA-PCL po hydrolizie maleje z 212,3 nm do 148,3 nm, a współczynnik szorstkości z 1.29 do 1.11. Natomiast sztywność membrany wzrosła. Zmiany te wykazały korzystny efekt na żywotność i obszar rozprzestrzeniania się komórek. Za pomocą metody AFM wykazałem istotną statystycznie zmianę wartości modułu Younga dla komórek hodowanych na modyfikowanych membranach PGA-PLA-PCL. Natomiast powierzchnia membrany PGA-PCL po hydrolizie nie uległa tak drastycznym zmianom. Zwiększeniu ulegają jedynie pory (średnica wzrasta z 8 do 15nm) co może świadczyć, że hydroliza przebiegła wewnątrz materiału. Potwierdzają to zdjęcia przekroju membrany wykonane za pomocą SEM. RMS wzrasta, podczas gdy współczynnik szorstkości i sztywność pozostają bez zmian. Nie stwierdzono wpływu hydrolizy membrany PLA-PCL na żywotność i właściwości mechaniczne badanych komórek

2.2.2. Opracowanie biosensorów do badania celów biologicznych technikami AFM i QCM na bazie żywych komórek

Jak już wcześniej wspomniano, bardzo istotne jest opracowywanie specyficznych bezznacznikowych biosensorów z wykorzystaniem żywych komórek w celu badania wpływu różnych czynników na przeżycie i właściwości wybranego rodzaju komórek zdrowych i patologicznych. W przeprowadzonych badaniach wykonano szereg optymalizacji warunków niezbędnych do uzyskania specyficznych biosensorów zapewniających powtarzalne pomiary w technice AFM i QCM z na bazie żywych komórek.

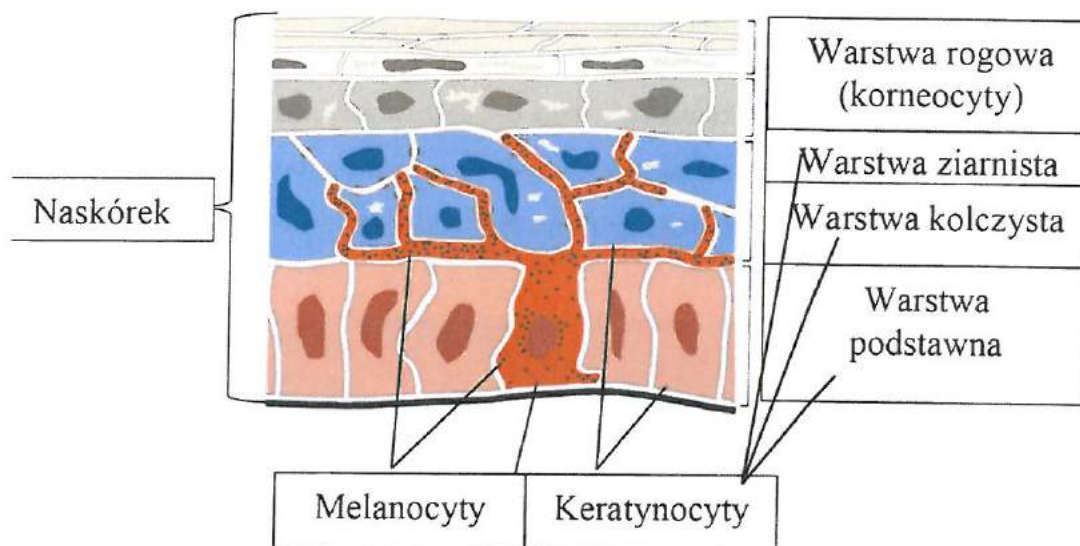
Optymalizacja metody stosowanego bezznacznikowego biosensora wymaga wielu eksperymentalnych etapów, w wyniku których uzyskujemy integrację procesu detekcji, właściwej powierzchni biosensora oraz poprawnej technologii przepływu fazy ciekłej. Istotne jest też właściwe przygotowanie wybranego materiału badawczego (małe molekuly, peptydy, białka, receptory powierzchniowe, całe komórki). Rodzaj badanej próby stawia określone wymagania właściwych warunków pomiaru. Stosowana metodyka obejmuje bezpośrednie wiązanie ligandu: analit jest wiązany przez unieruchomiony na biosensorze ligand. Ta metoda jest stosowana w badaniach kinetyki wiązania oraz przy mapowaniu miejsc wiążących. Immobilizacja ligandu (małe cząsteczki, peptydy, białka) na powierzchni biosensora może zachodzić przez wiązanie kowalencyjne lub jako wiązanie na zasadzie powinowactwa często z zastosowaniem różnych grup markerowych- tagów) i odbywa się według dobrze poznanych i opisanych metod. Do utworzenia wiązania kowalencyjnego wykorzystywane są grupy aminowe, karboksylowe oraz tiolowe.

Odrębny rodzaj biosensora stanowią biosensory wykorzystujące żywe komórki jako ligandy. Uzyskanie takiego układu wymaga optymalizacji warunków pozwalających na hodowlę komórek na zmodyfikowanej powierzchni biosensora zapewniającej możliwość adhezji, przeżycia i proliferacji komórek. Ponieważ te właściwości zależą od typu komórek niezbędne jest eksperymentalne ustalenie odpowiednich warunków zapewniających prawidłowe funkcjonowanie takiego biosensora i powtarzalność dokonywanych pomiarów. Dalsze etapy to sprawdzenie właściwej aktywności immobilizowanego ligandu i opracowanie właściwej metody regeneracji biosensora, która powinna prowadzić do całkowitej dysocjacji badanego analitu od ligandu, przy zachowaniu całkowitej aktywności ligandu. Opracowanie optymalnych warunków pomiaru dotyczy wyboru właściwego układu buforowego i procedury płukania oraz optymalnej temperatury. Należy również ustalić pozytywne i negatywne kontrole i właściwą procedurę pomiaru. Osobny problem stanowi właściwe przygotowanie badanego analitu.

2.2.2.1. Wybór komórek skóry stanowiących model badawczy

Skóra jest największym narządem człowieka (ok. 2 m² powierzchni), którego głównym zadaniem jest odbiór bodźców z zewnętrznego środowiska oraz ochrona organizmu przeciwko szkodliwym czynnikom. Narząd ten składa się z trzech warstw: naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej. Najbardziej zewnętrzną warstwę, naskórek, tworzą keratynocyty, komórki nabłonka płaskiego skóry o specyficznych właściwościach. Powstają z komórek macierzystych warstwy podstawnej i podlegają różnicowaniu tworząc kolejne warstwy: kolczystą i ziarnistą, aż do utworzenia zrogowaciałej warstwy martwych komórek korneocytów, które podlegają złuszczeniu. W warstwie podstawnej pomiędzy keratynocytami zlokalizowane są komórki barwnikowe melanocyty (Rys.3.) Keratynocyty charakteryzuje duży potencjał proliferacji oraz końcowego różnicowania. Oprócz funkcji tworzenia bariery przenikania, keratynocyty pełnią zasadniczą rolę jako immunologiczni „strażnicy” skóry przez inicjację, modulowanie i regulację reakcji zapalnej naskórka poprzez wydzielanie specyficznych cytokin. Należy zaznaczyć, że skóra jest w sposób ciągły poddawana wpływowi środowiska i cały szereg czynników prowadzi do zaburzenia jej homeostazy i reakcji podrażnienia. Ponieważ stale uzyskiwane są nowe substancje biologiczne i syntetyzowane chemiczne, istotną staje się ocena bezpieczeństwa stosowania tych związków. Stosowane dotychczas testy *in vivo* na zwierzętach podlegają ścisłym ograniczeniom natomiast badania na komórkach (wydzielanie cytokin prozapalnych) są stosunkowo drogie i czasochłonne, natomiast okluzyjne testy naskórkowo-płatkowe, służące do oceny potencjału drażniącego substancji chemicznych wymagają specjalnych pozwoleń i udziału wybranego panelu probantów. Dlatego istotne jest opracowanie alternatywnych metod w celu badań przesiewowych.

Jako model w większości badań stosowałem hodowlę komórek naskórka skóry ludzkiej: keratynocyty HaCaT. Komórki te stanowią spontanicznie unieśmiertelnioną linię ludzkich keratynocytów, rosnącą warstwowo i wykorzystywaną w wielu badaniach. Należy zaznaczyć, że komórki te są mają zmutowany gen białka p53, który należy do podstawowych genów kontrolujących cykl komórkowy. Stwierdzono jednak, że linia ta nie posiada właściwości spontanicznej transformacji nowotworowej i reaguje na czynniki prozapalne i alergizujące, dlatego stanowi dogodny model do wielu testów substancji stosowanych w kosmetologii i medycynie (Boukamp 1988; van de Sandt 1999).



Rys. 3. Schemat budowy ludzkiego naskórka.

2.2.3. Diagnostyka i ocena efektywności działania naturalnych substancji ochronnych przeciwko uszkodzeniom skóry czynnikami chemicznymi i fizycznymi [H8, H9]

2.2.3.1. Diagnostyka reakcji kontaktowego zapalenie skóry *in vitro* [H8]

Kontaktowe zapalenie skóry wynikające z reakcji podrażnienia – ICD (ang. *irritant contact dermatitis*), nazywane również potocznie podrażnieniem skóry (ang. *cutaneous irritation*), jest definiowane jako szybko pojawiająca się lokalna reakcja skóry wobec różnorodnych bodźców zewnętrznych (chemicznych, fizycznych i biologicznych), indukujących reakcję zapalną skóry bez udziału mechanizmów immunologicznej reakcji nadwrażliwości, podczas gdy alergiczne kontaktowe zapalenia skóry – ACD (ang. *allergic contact dermatitis*), należy do IV typu reakcji nadwrażliwości i wymaga aktywacji specyficznych komórek adaptacyjnej reakcji układu immunologicznego. Ponieważ oba typy reakcji rozpoczynają się reakcją zapalną i wytwarzają podobne objawy jak zaczerwienienie, obrzęk, suchość i złuszczenie naskórka, swędzenie i ból, prawidłowa diagnoza następuje z trudnością (Wells 2004). Kliniczne rozpoznanie tych dwóch procesów stanowi często duże wyzwanie, ponieważ morfologia oraz histopatologia kontaktowych i alergicznych reakcji zapalnych skóry są trudne do rozróżnienia w ramach subiektywnej oceny histopatologa, natomiast metody zapobiegania i leczenia powinny być zróżnicowane. Prawidłowa diagnoza wymaga wykonania zaawansowanych badań wydzielanych immunoglobulin i cytokin.

Objawy kliniczne oraz przebieg ICD zależą od wielu czynników zewnętrznych i wewnętrznych. Każdy związek drażniący może wywołać różną postać podrażnienia skóry, w zależności od stężenia, czasu kontaktu i jego częstotliwości oraz wielu innych czynników. Powstanie ostrego podrażnienia skóry jest możliwe w szczególnych warunkach ekspozycji, takich jak odpowiednio wysokie stężenie i czas kontaktu oraz warunki aplikacji.



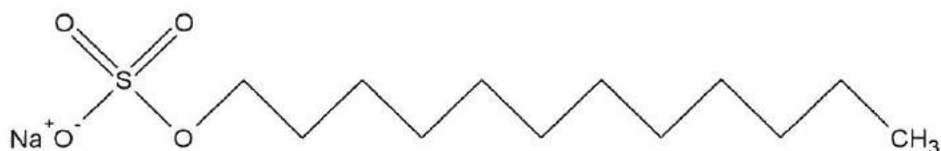
Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry



Kontaktowe podrażnienie skóry

Rys. 4. Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry i kontaktowe podrażnienie skóry.
(Courtesy American Academy of Dermatology)

Modelowym anionowym związkiem powierzchniowo czynnym, wykazującym działanie drażniące jest sól sodowa siarczanu alkoholu dodecyłowego (wg. Nomenklatury INCI: Sodium Lauryl Sulfate, SLS) [H8].

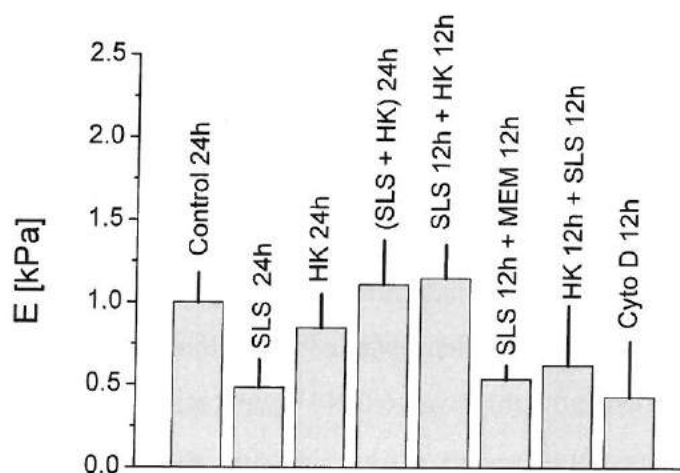


Rys.5. Sól sodowa siarczanu alkoholu dodecyłowego

Jego wybór jako przedmiotu badań został podyktowany tym, że jest to związek łatwo dostępny, otrzymywany w wyjątkowo czystej postaci, co pozwala różnym zespołom

badawczym pracować na tym samym materiale. Ponadto nie wykazuje toksyczności systemowej, nie jest kancerogeny, a reakcja alergiczna organizmu poddanego działaniu tego związku występuje rzadko. Stopień podrażnienia skóry wywołany przez SLS jest proporcjonalny do zastosowanego stężenia, co pozwala kontrolować przebieg badania. Co więcej, objawy podrażnienia skóry, spowodowanego przez SLS szybko ustępują. Ocenialiśmy żywotność komórek poddawanych działaniu SLS i SLS z dodatkiem hydrolizatów keratyny (HK) w różnych stosunkach molowych (2:1, 5:1). Wraz ze wzrostem stężenia SLS w roztworze obserwowano coraz silniejsze ograniczenie proliferacji komórek. Dla stężeń >50 mg/ml zaobserwowano bardzo silne ograniczenie proliferacji. HK ograniczały niekorzystny wpływ SLS na żywotność komórek. Najsilniejszy efekt odnotowano dla roztworu SLS:HK w stosunku molowym 2:1. Keratynocyty HaCaT poddane działaniu badanych związków zostały zobrażone za pomocą mikroskopu optycznego i mikroskopu AFM.

Wykorzystując możliwość precyzyjnego monitorowania siły oddziaływania między ostrzem a powierzchnią w zależności od odległości, jaką daje mikroskop AFM oraz wybierając odpowiedni model opisujący zachowanie elastycznej powierzchni po przyłożeniu zewnętrznej siły obliczyłem moduł Young'a dla wszystkich zobrażowanych keratynocytów (Rys. 6).



Rys.6. Zmiana wartości znormalizowanego modułu Young'a dla kontrolnych komórek HaCaT, oraz traktowanych SLS, HK i cytochalazyną D [H8]

Wartości obliczonego modułu Young'a dla komórek traktowanych badanymi związkami wykazały korelację z zaobserwowanymi zmianami w organizacji cytoszkieletu aktynowego. W wypadku komórek traktowanych SLS zaobserwowano silną reorganizację w obrębie cytoszkieletu aktynowego, podobną do działania cytochalazyny D (Sokolov 2006),

która blokując dołączanie nowych monomerów aktywnych do filamentu, powoduje rozpad już istniejących mikrofilamentów.

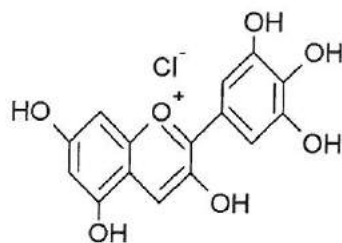
W przeprowadzonej serii badań na komórkach HaCaT wykazałem możliwość zastosowania metod bezznacznikowych do charakterystyki właściwości mechanicznych pozwalających na diagnostykę reakcji podrażnienia skóry *in vitro* [H8]. Opracowana przeze mnie metodyka stanowi nowatorskie podejście do testowania skuteczności surowców jako alternatywa do testów na zwierzętach. Została wykorzystana do opracowania nowego produktu kosmetycznego mogącego w znacznym stopniu opóźnić proces starzenia się skóry, a przede wszystkim zminimalizować niekorzystny wpływ czynników zewnętrznych, które w istotny sposób przyspieszają starzenie się organizmu [P11, P13]

Ponadto, moje badania zostały w pełni potwierdzone przez opublikowane 3 lata później wyniki (Choi 2016). Zespół ten badał wpływ SLS na biomechaniczne oraz biologiczne właściwości ludzkich keratynocytów i potwierdził, że zmiany w morfologii, proliferacji komórek i sekrecji cytokin występują w wysokich stężeniach SLS (25 μ M), podczas gdy zmiany elastyczności i szorstkości powierzchni oceniane techniką AFM są widoczne już przy niższych stężeniach (10 μ M). Sugeruje to, że badanie mechanicznych właściwości keratynocytów mogą być stosowane jako biomarkery do oceny bezpieczeństwa różnych czynników zewnętrznych stosowanych na skórę jako kosmetyki lub leki.

2.2.3.2. Ocena efektywności działania naturalnych substancji ochronnych przeciwko uszkodzeniom skóry promieniowaniem UVB [H9]

Jednym z najbardziej szkodliwych czynników fizycznych dla naskórka i skóry jest promieniowanie ultrafioletowe, zarówno naturalne jak i sztuczne. Stwierdzono, że najbardziej szkodliwe jest wysokoenergetyczne promieniowanie UVB, które powoduje liczne uszkodzenia naskórka i skóry przez destrukcję dwuniciowego DNA i generacje aktywnych form tlenu (ROS) powodując podrażnienia, oparzenia, przedwczesne starzenie oraz występowania nowotworów skóry (Masaki 2009).

Delfinidyna, roślinny barwnik (aglikonowa forma antocyjaniny) jest znana jako efektywny czynnik ochronny przed destrukcyjnym wpływem promieniowania UVB na skórę, w porównaniu do innych badanych związków antocyanidynowych (Kwon et al. 2009).

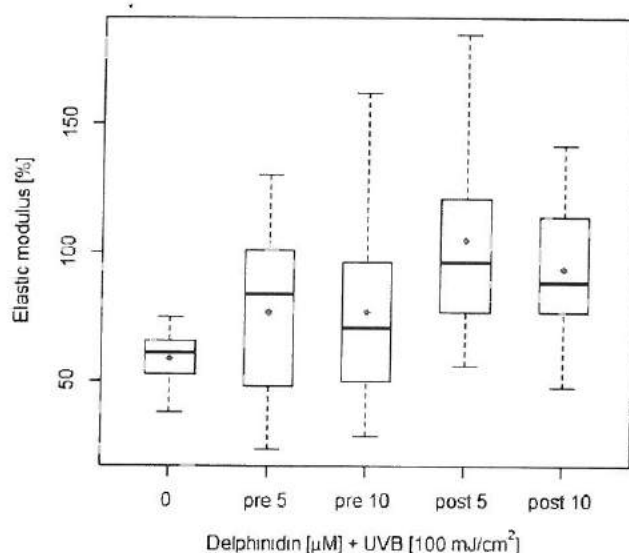


Rys. 7. Wzór strukturalny delfinidyny

Ochronne działanie delfinidyny przeciwko skutkom promieniowania UVB (produkcji aktywnych metabolitów tlenu) zostało wykazane dla keratynocytów (Afaq 2007). Dotychczas nie badano wpływu delfinidyny na mechaniczne właściwości komórek skóry.

Przeprowadziłem badania ochronnego działania delfinidyny na modelu *in vitro* keratynocytów HaCaT [H9]. Celem była ocena zmian modułu elastyczności komórek w wyniku ekspozycji na promieniowanie UVB oraz potencjalnego ochronnego wpływu różnych stężeń delfinidyny na ten parametr. Oceniono również korelację reorganizacji cytoszkieletu aktywnego keratynocytów oraz wpływ delfinidyny na mechanizm naprawy genomowego dwuniciowego DNA komórek uszkodzonego przez promieniowanie UVB.

Wykazałem istotny statystycznie ochronny wpływ niecytotoksycznych dawek delfinidyny na przywrócenie modułu elastyczności znacznie obniżonego przez promieniowanie UVB. Testy statystyczne były dostosowane do stwierdzonego rozkładu obserwacji. Innych testów używano w przypadku stwierdzenia zgodności z rozkładem normalnym, a innych w pozostałych przypadkach.



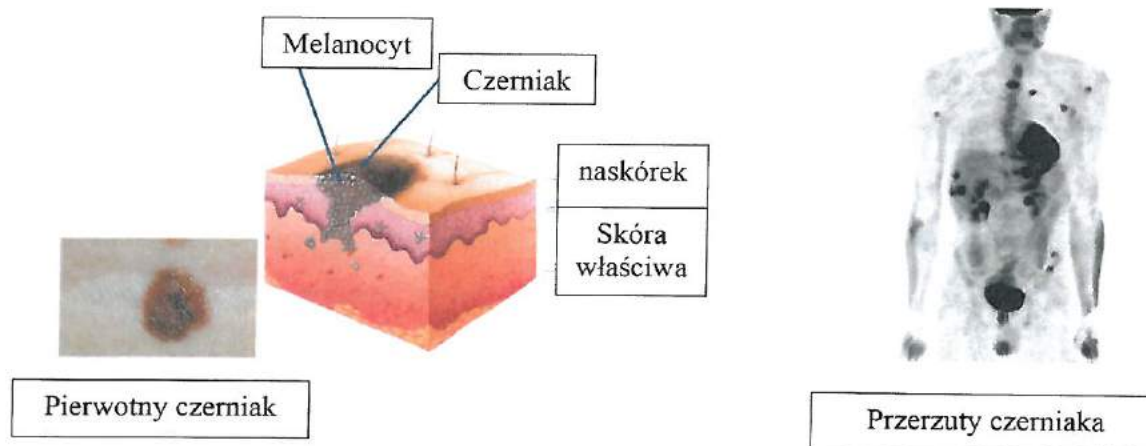
Rys.8. Zmiana wartości znormalizowanego modułu Young'a dla komórek HaCaT naświetlonych dawką 100 mJ/cm², a następnie potraktowanych delfinidyną. [H9]

Również pozostałe parametry uległy istotnej poprawie. Potwierdzono, że stosowanie delfinidyny przed, w czasie oraz po nadmiernej ekspozycji skóry na promieniowanie słoneczne, może stanowić ochronę przed jego skutkami, również inicjacją nowotworów skóry.

Opracowana metoda [H9] została zastosowana do badań efektywności składników ochronnych kosmetyków stosowanych w celu zapobiegania i usuwania skutków promieniowania UVB naturalnego (słońce) i sztucznego (solaria).

2.2.4. Badanie możliwości zastosowania metod AFM i QCM do diagnostyki progresji raka skóry (czerniaka).

Kolejnym zadaniem badawczym było opracowanie metody pozwalającej na identyfikację komórek czerniaka w różnych fazach rozwoju. Zagrożenie czerniakiem (melanoma), nowotworem skóry o najwyższej śmiertelności, wykazuje znaczny wzrost w ciągu ostatnich dekad w światowej populacji. Jest on uważany za jeden z najbardziej niebezpiecznych nowotworów skóry, głównie ze względu na fakt, iż nie istnieje skuteczne leczenie po wejściu choroby w fazę przerzutów (Alexander 2011). Pochodzenie czerniaka z transformowanych komórek barwnikowych naskórka - melanocytów, podlegających różnicowaniu z grzebienia neuronowego może wyjaśniać jego wysoki potencjał metastatyczny w porównaniu do innych typów raka skóry. Rokowania zależne są od głębokości naciekania oraz stopnia zaawansowania klinicznego. W początkowych fazach choroby (grubość naciekania do 1mm) wyleczalność sięga nawet 90-100%. Do tej pory zostały wyróżnione trzy kolejne fazy rozwoju czerniaka skóry: nieinwazyjny wzrost in situ (RGP), stymulacja procesu tworzenia przerzutów (faza rozwoju naczyń krwionośnych, VGP) prowadząca do wnikania komórek do naczyń krwionośnych oraz faza rozwoju przerzutów (Rys.9).



Rys.9. Fazy rozwoju czerniaka

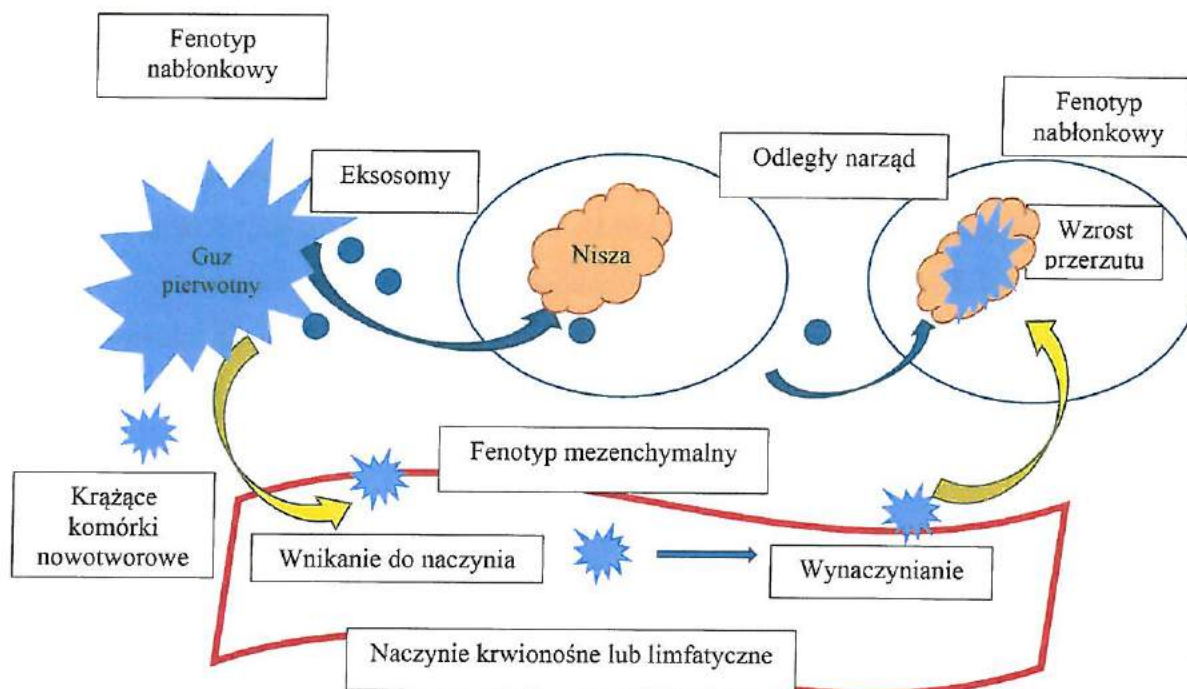
Transformacja od pierwotnego nowotworu do przerzutów zależy od kompleksowych mechanizmów genetycznych i epigenetycznych prowadzących do niekontrolowanych podziałów, angiogenezy, odporności na apoptozę i procesów inwazji. Poznanie molekularnych mechanizmów procesu tworzenia przerzutów czerniaka jest podstawowym warunkiem uzyskania skutecznych metod wczesnej diagnostyki i właściwej terapii pacjentów z wysokim ryzykiem wystąpienia przerzutów. W związku z tym niezbędna jest analiza wielu czynników progresji nowotworów (biomarkerów) w celu uzyskania właściwej diagnozy i prognozy czerniaka.

Przejęcie od epitelialnego do mezenchymalnego fenotypu (EMT) należy do kluczowych procesów embriogenezy umożliwiających różnicowanie tkanek i narządów oraz naprawy uszkodzonych tkanek. Równocześnie proces ten jest odpowiedzialny za występowanie poważnych patologii jak zwłóknienia narządów oraz przede wszystkim za progresję nowotworów. Epitelialny fenotyp stanowią komórki zróżnicowane, o określonej polarności. Ich cechy to: przyczepność międzykomórkowa oraz do macierzy zewnątrzkomórkowej, polaryzacja szczytowo-bazalna. Mezenchymalny fenotyp przywraca komórkom mobilność i zdolność do inwazji oraz różnicowania przez indukcję właściwości podobnych do właściwości komórek macierzystych, a więc odporności na apoptozę i starzenie oraz powodowanie immunosupresji i oporności na chemoterapię. Przejęcie EMT jest odwracalne do przejścia mezenchymalno-nabłonkowego (MET) i w procesie rozwoju embrionu występuje kilka takich przejść. (Thiery 2009). Podobnie w procesie rozwoju nowotworu EMT/MET umożliwia komórkom rakowym migrację do oddalonych lokalizacji w organizmie i tworzenie przerzutów

przez osiedlanie się i proliferację w nowej lokalizacji. Zbadano, że bardzo wiele dróg sygnałowych i różnych czynników indukuje EMT/TEM podczas rozwoju embrionalnego, gojenia ran i w procesach patologicznych. Do czynników odpowiedzialnych za indukcję EMT w różnych chorobach nowotworowych należą czynniki transkrypcyjne (SNAI1/2, ZEB, TWIST1, GRHL2, OVOL1/2, and PRRX1), regulatory post-translacyjne (miRNAs), oraz kontrola epigenetyczna. (Nieto 2016). Należy zaznaczyć, że szereg wymienionych czynników transkrypcyjnych może podlegać regulacji na poziomie posttranslacyjnym poprzez ich lokalizacje oraz procesy degradacji. Istotny jest wpływ mikrośrodowiska kancerogenego; hipoksja oraz przewlekłe reakcje zapalne są istotne w progresji nowotworu i tworzeniu przerzutów (Thiery 2009).

Złożony mechanizm procesu tworzenia przerzutów (Rys.10) wymaga różnych strategii komórek metastatycznych pozwalających na ich przeżycie w krążeniu i kolonizację w odległej lokalizacji. Należy tu podkreślić rolę oddziaływania mikrośrodowiska zawierającego komórki stromy lub immunologiczne wpływające na ten proces, a zwłaszcza możliwość rekrutacji komórek promujących tworzenie metastaz przed ich osiedleniem w specyficznej lokalizacji. Stwierdzono istotną rolę eksosomów wydzielanych zarówno przez komórki epitelialne jak i mezenchymalne. Eksosomy są zewnątrzkomórkowymi cząsteczkami sygnalizacyjnymi wydzielanymi przez komórki eukariotyczne w warunkach fizjologicznych oraz w procesach nowotworowych, w których promują tworzenie i progresję nowotworu (Greening 2015). Eksosomy pochodzące z komórek guza nowotworowego przenoszą sygnały promujące EMT oraz zwiększają migracyjne i inwazyjne właściwości komórek docelowych, a także powodują przekształcanie komórek stromy i tworzenie pre-metastatycznych nisz (Syn 2016). Postuluje się, że komórki nowotworowe podlegające EMT znajdujące się w krążeniu mogą pochodzić z komórek przechodzących tę zmianę *in situ* w guzie pierwotnym lub mogą osiągać pośrednie fenotypy w krążeniu, zwłaszcza pod wpływem tworzenia agregatów z płytkami produkującymi duże ilości transformującego czynnika wzrostu (TGF-beta) (Derynck 2014).

Dalsze utrudnienie stanowi fakt, że według ostatnich badań EMT można rozpatrywać jako proces ciągły a komórki mogą reprezentować stabilne fenotypy epitelialny (E), pośredni (EM) i mezenchymalny (M), ale również niestabilne fazy tego przejścia. (Nieto 2016). Sprawia to, że rozpoznanie komórek wędrujących raka należących do typu mezenchymalnego, czyli tworzących przerzuty jest trudne i niejednoznaczne. Dlatego każda nowa metoda umożliwiająca takie badanie jest bardzo ważna i istotna w kontroli przebiegu choroby nowotworowej.



Rys. 10. Schemat procesu tworzenia przerzutów (wg. Lobb 2017)

Wszystkie komórki w organizmie żyją i proliferują w kontakcie z płynami ustrojowymi i macierzą pozakomórkową (ECM). Sygnały przeżycia lub śmierci wysyłane z mikrośrodowiska regulują wszystkie procesy homeostazy tkanek i narządów. Obecnie proces nowotworzenia rozpatrywany jest nie tylko jako utrata właściwej regulacji dróg sygnałowych stanowiących o przeżyciu, starzeniu lub programowej śmierci, ale również jako wynik regulatorowych właściwości macierzy pozakomórkowej i przetwarzania sygnałów mechanicznych. Potwierdzono, że właściwości mechaniczne ECM wpływają na proces nowotworzenia i że wzrost sztywności ECM występuje w obserwowanych nowotworach *in vivo*. Podobnie *in vitro* normalne komórki hodowane na sztywnych podłożach mogą podlegać spontanicznej transformacji nowotworowej (Huang 2005; Leventhal 2009).

2.2.4.1. Opracowanie biosensora na bazie oddziaływania lektyna/specyficzne glikany nowotworowe z zastosowaniem karboksypeptydazy Y jako modelowego białka [H10]

Przeprowadziłem badania mające na celu opracowania biosensora do szybkiego oznaczania potencjału tworzenia metastaz czerniaka skóry z wykorzystaniem materiału pobranego podczas resekcji skórnej czerniaka, a także zbadania potencjalnych leków na

progresję czerniaka i tworzenie przerzutów. Jedną ze stosowanych procedur do wykrywania przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego są badania oddziaływania specyficznych glikanów obecnych na powierzchni komórek guza pierwotnego i jego przerzutów ze specyficznymi lektynami, przy użyciu technik mikrowagi kwarcowej w trybie śledzenia dyssypacji energii (QCM-D) i mikroskopii sił atomowych (AFM). Metoda QCM pozwala na analizę profilu glikozylacji białek błonowych z użyciem nieznakowanej lektyny i prowadzenia pomiarów w czasie rzeczywistym. Wyznaczone na tej podstawie stałe asocjacji i dysocjacji, zmiany entalpii i swobodna energia Gibbsa, umożliwiają termodynamiczną i kinetyczną charakterystykę kompleksów.

Dlatego, niezwykle ważnym aspektem badania czerniaka stała się metodyka polegająca na wykorzystaniu specyficznych oddziaływań pomiędzy powierzchniowymi glikanami komórkowymi stanowiącymi specyficzne markery czerniaka i lektynami. Powierzchniowe glikany komórkowe są liniowymi lub rozgałęzionymi oligosacharydami przyłączonymi do białek i lipidów błony komórkowej. Ze względu na złożoną budowę (zawierają N-acetylgalaktozaminę, galaktozę, kwas neuraminowy, N-acetylglukozaminę, kwas sialowy, mannozę, glukozę, fukozę i inne) kodują wiele informacji ważnych dla różnych procesów komórkowych. Zmiany w składzie oligosacharydów towarzyszą wielu chorobom, zwłaszcza nowotworowym. Zmiany te ułatwiają procesy tworzenia przerzutów i są obecnie stosowane jako markery nowotworowe. Potwierdzono istotną rolę zmienionych glikanów w różnych fazach progresji czerniaka. Należą do nich zwiększona obecność hypersialilowanych N-oligosacharydów lub niekompletnych glikanów. Jednym z najistotniejszych narzędzi badania zmian powierzchniowych glikanów komórkowych są ich specyficzne interakcje z lektynami.

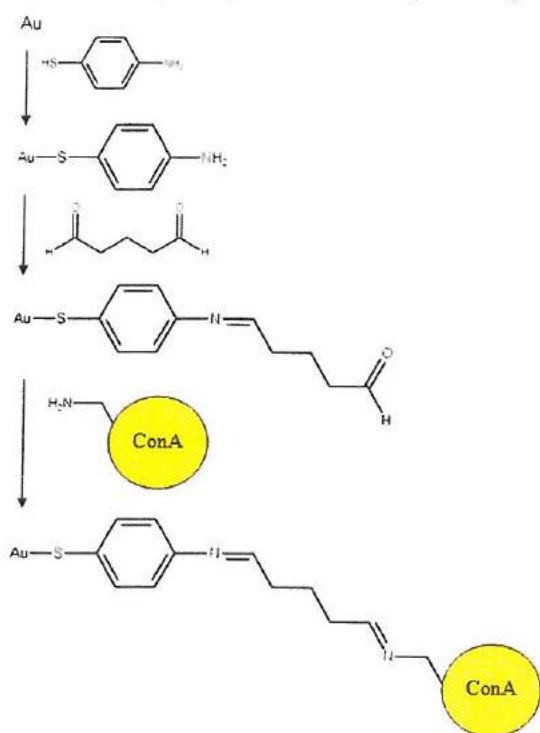
Lektyny są grupą specyficznych glikoprotein pochodzenia zwierzęcego i roślinnego specyficznie wiążących się z dużym powinowactwem z pewnymi typami glikanów. Reakcje te stosowane są jako markery przebiegu procesu nowotworzenia. Należy zaznaczyć, że większość lektyn stosowanych obecnie jako czynniki różnicujące linie pierwotne i metastazy jest pochodzenia roślinnego. Najczęściej stosowanymi lektynami są konkanawalina A (Con A), lektyna z *Sambucus nigra* (SNA-1), lektyna z *Lens culinaris* (LcL), lektyna z *Helix pomatia* (HPA) i *Maackia amurensis* (MAA). Wykazano, że Con A wiąże się wybiórczo do glikanów markerowych komórek nowotworowych, a nie reaguje z markerami komórek normalnych.

Możliwość obserwacji oddziaływania lektyny z glikoproteinami w czasie rzeczywistym jest ważną zaletą komplementarnych technik QCM-D i AFM. Za pomocą QCM wyznaczane są parametry kinetyczne wszystkich etapów reakcji tj. stałe szybkości asocjacji i dysocjacji,

równowagową stałą reakcji oraz energię swobodną Gibbsa, podczas gdy spektroskopia AFM jest stosowana do uzyskania parametrów opisujących rozpad badanego kompleksu jak położenie bariery potencjału i stałą szybkości dysocjacji.

Wykorzystując te techniki opracowałem modele badawcze służące do analizy powinowactwa lektyny Con A i LcL do karboksypeptydazy Y (jako modelowego białka) [H10], a także do rozróżnienia ludzkich linii komórkowych czerniaka z różnych faz rozwojowych [H11]. W celu opracowania poprawnie działających sensorów lektyny zostały naniesione na przetworniki mikrowagi kwarcowej z elektrodą złotą, z zastosowaniem modyfikacji powierzchni grupami tiolowymi, tworzącymi na powierzchni złota stabilne monowarstwy uzyskane w wyniku uproszczenia procedury i jej optymalizacji (Rys. 11).

Stosowano przetworniki inkubowane w 8 mM roztworze p-aminotiofenolu w etanolu przez 16 h. Przetworniki poddawano sonikacji w etanolu w celu usunięcia niezwiązanego kowalencyjnie p-aminotiofenolu. Po sonifikacji sensor przepłukiwano etanolem i wodą milliQ oraz suszono w atmosferze gazu obojętnego. Następnie inkubowano w 2,5% wodnym roztworze aldehydu glutarowego przez 30 minut i przemywano buforem. Sensor z tak przygotowaną powierzchnią przenoszono do komory pomiarowej, do której wprowadzano roztwór immobilizowanego białka w zamkniętym przepływie z szybkością 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ przez 1 h. Następnie komorę pomiarową przemywano 4% roztworem glicyny w celu zablokowania reszt aldehydowych, które nie przereagowały z białkiem.



Rys. 11. Immobilizacja lektyny Con A na powierzchni Au

W przeprowadzonych badaniach analizowałem oddziaływanie dwóch lektyn, ConA i LcL, z mannozowym analitem karboksypeptydazą Y. Otrzymane wyniki umożliwiły wyznaczenie stałych kinetycznych analizowanych kompleksów. Wyznaczone wartości równowagowych stałych asocjacji badanych kompleksów wskazują na silniejsze oddziaływanie Con A z analitem mannozowym. Potwierdzają to również otrzymane wartości energii swobodnej Gibbsa. Wynik ten, jest w zgodzie z wartościami wyznaczonymi dla innych analitów mannozowych. Wykazano, że oddziaływanie Con A jest silniejsze niż LcL dla metylo α -D-mannopiranozydu (Schwarz 1993). Dla glikoprotein zawierających więcej niż sześć cząsteczek mannozowych wartość K_a powinna być wyższa niż $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Gallego 2004). Zatem wynik otrzymany dla kompleksu Con A-CaY, $K_a = 2,25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, w pełni potwierdza tę zależność, biorąc pod uwagę, że karboksypeptydaza Y zawiera w jednym łańcuchu cukrowym około trzynastu reszt mannozowych. Otrzymane wyniki są w bardzo dobrej korelacji z wynikami uzyskanymi metodą AFM [H10]. Ponadto analiza AFM wykazała, że pozycja bariery potencjału obu kompleksów jest względem siebie przesunięta. Na kinetykę i termodynamikę tworzenia i dysocjacji kompleksów może wpływać nie tylko multiwalencyjność liganda, lecz również multiwalencyjność analitu.

Karboksypeptydaza Y jest enzymem posiadającym w swojej strukturze cztery łańcuchy oligosacharydowe (GlcNAc)₂(Man)₁₃ (Hashimoto 1981), przy czym odległość pomiędzy dwoma łańcuchami oligosacharydowymi wynosi ok. 60 Å (Dumoulin 1999). W związku z tym, możliwe jest jednoczesne związanie jednej cząsteczki karboksypeptydazy Y z dwoma miejscami wiążącymi liganda. Taka sytuacja może zdarzyć się jedynie w przypadku wiązania CaY za pomocą LcL, bo odległość pomiędzy miejscami wiązania sacharydów w Con A wynosi ok. 70 Å (Reynolds 2011). Wyniki równowagowej stałej asocjacji kompleksów otrzymane za pomocą QCM-D potwierdzają tę teorię. Porównując wartości otrzymane dla obu kompleksów wyliczone dwiema metodami – za pomocą izotermy Langmuira i czasów relaksacji, można zauważyć, że wyniki otrzymane dla kompleksu Con A- CaY są zgodne. Dlatego do badań z zastosowaniem biosensorów komórkowych jako analit wybrałem Con A.

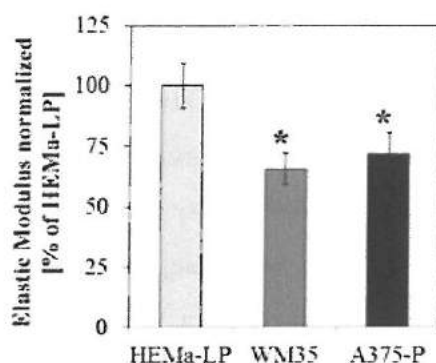
2.2.4.2. Opracowanie biosensora komórkowego na bazie oddziaływania lektyna/specyficzne glikany nowotworowe dla linii komórkowych czerniaka [H 11]

Należy zaznaczyć, że przeprowadzenie badań na całych komórkach w większym stopniu odpowiada warunkom *in vivo*, co nie jest możliwe w przypadku innych metod, wymagających izolacji glikoprotein błonowych.

Nowatorskim aspektem pracy [H11] było zastosowanie metod bezznackowych QCM-D/AFM do opracowania biosensorów komórkowych umożliwiających wczesne wykrywanie przerzutów czerniaka przez monitorowanie specyficznych powierzchniowych markerów komórek wchodzących w fazę metastazy (markery fenotypu mezenchymalnego), a tym samym na opracowanie szybszych i wydajniejszych technik diagnostyki i prognozy chorób nowotworowych. Opracowanie biosensora komórkowego odpowiedniego do takich badań wymagało optymalizacji stosowanych warunków eksperymentalnych. Istotnym parametrem było ustalenie właściwej szybkości przepływu roztworu białka przez komorę pomiarową. Zbyt mała szybkość przepływu roztworu białka przez komorę pomiarową może ograniczać możliwość stosowania modelu wykładniczego. Różnice we wpływie szybkości przepływu na oddziaływanie analit - ligand zaobserwowała również grupa badawcza wykorzystująca metodę alternatywną do QCM - rezonans plazmonów powierzchniowych (Drescher 2009). Komórki wysiano na sensory polistyrenowe, po 48h płukano PBS, delikatnie utrwalano 3,7% roztworem paraformaldehydu przez 30 min i po płukaniu umieszczano w celce pomiarowej mikrowagi. Badano dwie szybkości przepływu: 25 i 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Zastosowane prędkości są dosyć typowe dla tego typu pomiarów (Peiris 2012). Układ najpierw stabilizowano, a następnie wprowadzono roztwór lektyny i rozpoczynano właściwy pomiar. Szybszy przepływ roztworu spowodował oderwanie się większej ilości komórek, dlatego pomiary prowadzono przy przepływie 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Kolejnym etapem w optymalizacji procesu było ustalenie odpowiedniej gęstości komórek zlokalizowanych na sensorze. W tym celu wysiano na sensory kolejno $2,5 \times 10^4$ i 5×10^4 komórek i przeprowadzono badanie w sposób analogiczny jak poprzednio. Optymalizację pomiaru uzyskano w następujących warunkach: wysianie komórek o gęstości 5×10^4 komórek/sensor i inkubacja przez 48 h w 37°C . Po płukaniu komórki delikatnie utrwalano 3,7% roztworem paraformaldehydu przez 30 min. Ponownie płukano PBS, suszono w strumieniu argonu i montowano w komorze QCM.

Na podstawie uzyskanych wyników z AFM wykonanych dla 3 linii komórkowych (melanocyty HEMA-LP, z pierwotnego ogniska czerniaka o wzroście powierzchniowym WM35 oraz metastazą czerniaka do płuc A375-P) wykazano, że komórki prawidłowe znacznie różnią się odpornością na deformacje od komórek czerniaka natomiast wartość modułu

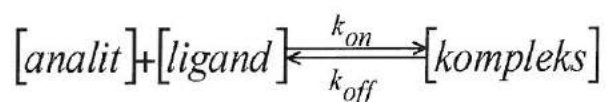
elastyczności dla komórek czerniaka pierwotnego WM35 i metastatycznego A375-P nie jest statystycznie istotna. (Rys. 12).



Rys.12. Wykres odporności na deformacje komórek czerniaka pierwotnego WM35 i metastatycznego A375-P w stosunku do komórek prawidłowych HEMa-LP[H11]

Natomiast badanie oddziaływania między liniami komórkowymi, a różnymi stężeniami lektyny Con A za pomocą QCM-D wykazało statystycznie istotne różnice w powinowactwie różnych fenotypów komórek do badanej lektyny.

Wprowadzenie równania kinetycznego dla procesu tworzenia kompleksu analit-ligand:



można znaleźć w pracy (Mori 2010). Ponieważ wraz z tworzeniem się kompleksu spada częstotliwość drgań sensora, scałkowaną postać równania kinetycznego można zapisać w następujący sposób:

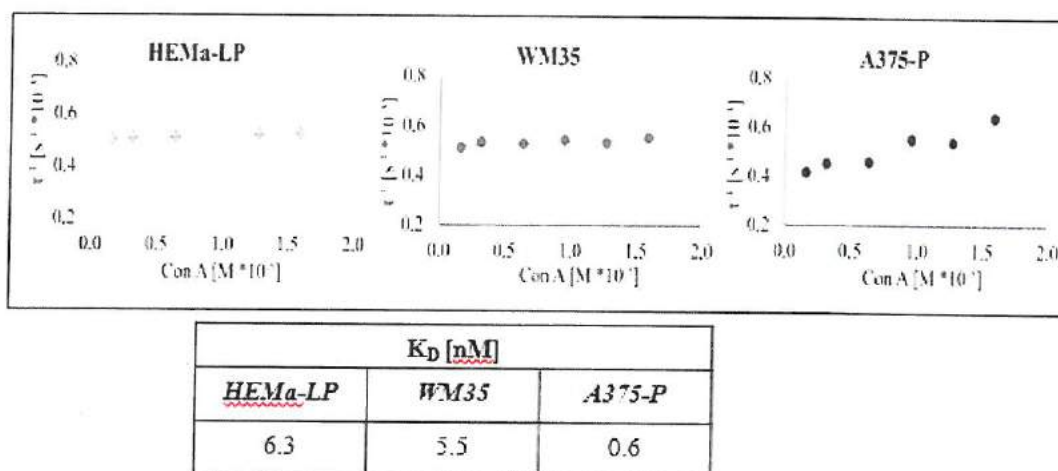
$$\Delta f = \Delta f_{max} \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right)$$

gdzie Δf to zmiana częstotliwości drgań, Δf_{max} to maksymalna zmiana częstotliwości drgań, a τ to czas relaksacji.

Wyliczenie czasu relaksacji (τ) dla zmierzonego stężenia i narysowanie jego odwrotnej liniowej zależności od stężenia wolnego białka umożliwia wyznaczenie wartości współczynnika kierunkowego prostej oraz wyrazu wolnego, czyli wielkości odpowiadających odpowiednio stałej szybkości asocjacji (k_{on}) i stałej szybkości dysocjacji (k_{off}).

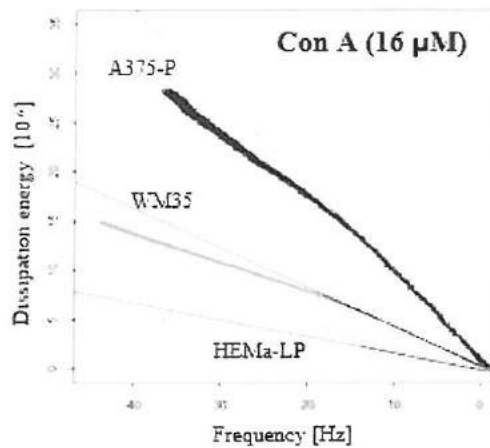
$$\tau^{-1} = k_{on}[\text{analit}] + k_{off}$$

Uzyskane wyniki z pomiarów oddziaływania różnych stężeń lektyny Con A z komórkami na sensorze polistyrenowym wykonane na QCM-D poddałem analizie z wykorzystaniem środowiska R. Zastosowałem model wykładniczy. Dopasowanie zostało sprawdzone metodami analizy regresji.



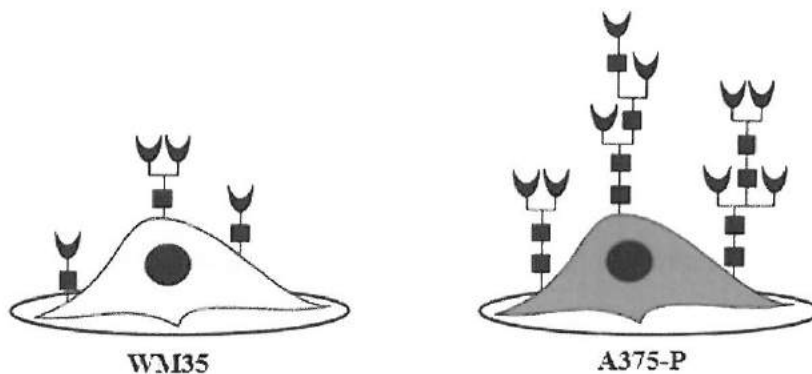
Rys.13. Zależność czasu relaksacji w funkcji stężenia lektyny Con A dla linii komórkowych oraz uzyskane wartości stałych dysocjacji dla kompleksu Con A/glikany tych komórek. HEMa-LP: melanocyty; WM35: pierwotny czerniak i A375-P czerniak metastatyczny [H11]

Stwierdziłem, że komórki przerzutu A375-P mają większe powinowactwo do Con A niż pozostałe dwie linie (Rys.13). W celu przeanalizowania struktury tworzącego się kompleksu wykreślona została zależność zmiany dyssypacji energii od zmiany częstotliwości rezonansowej. Zmiany w nachyleniu wykresu Df sugerują strukturalne zmiany tworzącego się kompleksu lektyna/glikokoniugat. Kąt nachylenia dla linii A375-P jest 2-krotnie większy niż dla linii WM35 i 4-krotnie większy niż dla linii HEMa-LP (Rys. 14).



Rys.14. Wykres Df dla pomiarów oddziaływania linii komórkowych z lektyną Con A. HEMa-LP: melanocyty; WM35: pierwotny czerniak i A375-P czerniak metastatyczny [H11]

Analiza MALDI-MS wyizolowanych z komórek glikoprotein wykazała obecność wielkocząsteczkowych glikoprotein w komórkach A375-P, natomiast w komórkach WM35 potwierdziła występowanie mniejszych glikoprotein (Ciołczyk-Wierzbička 2004). Zgromadzone dane z obu niezależnych analiz wykonanych różnymi technikami są zgodne i potwierdzają występowanie krótkich, mało rozgałęzionych glikoprotein terminalnie zakończonych α -D-mannozą lub α -D-glukozą na powierzchni komórek z pierwotnego ogniska nowotworu o wzroście powierzchniowym (WM35) i długich, rozgałęzionych struktur cukrowych na powierzchni komórek metastatycznych (A375-P) (Rys. 15).



Rys.15. Zaproponowany hipotetyczny model glikoprotein powierzchniowych na komórkach WM35 i A375-P na podstawie niezależnych badań za pomocą metod QCM-D/AFM [H11] i MALDI-MS (Ciołczyk-Wierzbička 2004)

Opracowany system pomiarowy QCM-D/AFM stanowi propozycję nowej metody diagnostycznej pozwalającej na szybką charakterystykę i typowanie komórek pierwotnego i metastatycznego czerniaka. Wprowadzenie tej metody wymaga dalszych, szeroko zakrojonych

badania komórek izolowanych od odpowiednio licznej grupy pacjentów z wykrytym czerniakiem w celu potwierdzenia rozpoznania stopnia zaawansowania nowotworu. Metodyka ta może także umożliwić badanie wpływu nowych substancji na hamowanie EMT w celu opracowania procedury pozwalającej na charakterystykę nowych środków terapeutycznych dla pierwotnego i zaawansowanego czerniaka.

3. Podsumowanie

Wyniki przedstawione w osiągnięciu naukowym są istotne z punktu widzenia projektowania i konstrukcji nowych biosensorów, wykorzystujących biologiczne struktury powierzchniowe do celów diagnostycznych. W ramach pracy habilitacyjnej zoptymalizowałem warunki działania komplementarnych technik AFM i QCM do badania właściwości żywych komórek dla zastosowania w innowacyjnych systemach detekcji bez użycia znaczników. Istotne dla tych metod było opracowanie różnych technik modyfikacji powierzchni przetworników.

Pierwszy etap pracy badawczej był poświęcony modyfikacji cienkich warstw złota do celów aplikacyjnych. Opracowałem nową metodę chemicznej modyfikacji powierzchni metalicznej poprzez naparowanie cienkich warstw złota i obróbkę termiczną. Za pomocą metod bezznacznikowych potwierdziłem mechanizm tworzenia dobrze zdefiniowanego stopu Au-Pt. Otrzymany stop powierzchniowy wykazywał takie same właściwości katalityczne jak platyna, natomiast w przeciwieństwie do Pt, na powierzchni stopu nie stwierdzono adsorpcji tlenu węgla, co ma istotne znaczenie praktyczne (zapobieganie zatruciu powierzchni katalizatora).

Zrealizowałem również możliwość uzyskania cienkowarstwowych pól złota o kontrolowanej geometrii przez modyfikację podłoża przed naparowaniem złota i dalszym trawieniem w parach Hg. Operację tę przeprowadzono na podłożach szklanych, polimerowych oraz mice. Opracowałem stosunkowo prosty, skuteczny sposób rozwijania powierzchni warstw złota, które mogą być stosowane jako elektrody w biosensorach, elektrody zbierające elektrony w procesach fotowoltaicznych.

W następnych etapach badań podjąłem zadanie odpowiedniej modyfikacji powierzchni przetworników dla uzyskania systemów biokompatybilnych z żywymi komórkami ludzkimi w warunkach *in vitro*. Wykazałem wpływ mechanicznych właściwości modyfikowanych warstw polimerowych oraz ich powierzchniowej struktury na przeżywalność komórek kostnych osteoblastów. Przeprowadzona modyfikacja (hydroliza) membran polimerowych wykazała korzystny efekt na żywotność i obszar rozprzestrzeniania się keratynocytów. Takie warstwy

polimerowe mogą być stosowane jako powierzchnie przetworników *in vitro* oraz zostać wykorzystane do wytwarzania opatrunków na trudno-gojące się rany i jako materiały skóro-zastępcze i transplanty ubytków kostnych.

W przeprowadzonej serii badań na unieśmiertelnionych ludzkich keratynocytach HaCaT wykazałem możliwość zastosowania metod bezznacznikowych do charakterystyki właściwości mechanicznych pozwalających na diagnostykę reakcji podrażnienia skóry *in vitro* oraz do badań efektywności składników ochronnych kosmetyków stosowanych w celu zapobiegania i usuwania skutków nadmiernego promieniowania UVB dla skóry. Opracowana przeze mnie metodyka umożliwi nowatorskie podejście do testowania przesiewowego toksyczności oraz badania skuteczności działania surowców kosmetycznych jako alternatywa do testów na zwierzętach.

Najważniejszym osiągnięciem moich badań było zastosowanie komplementarnych metody bezznacznikowych QCM-D/AFM do opracowania biosensorów komórkowych umożliwiających wczesne wykrywanie przerzutów czerniaka przez monitorowanie oddziaływania specyficznych powierzchniowych rozgałęzionych glikanów z odpowiednimi lektynami jako markerów komórek wchodzących w fazę metastazy (markery fenotypu mezenchymalnego). Dobór i charakterystyka ConA jako analitu dla glikanów normalnych melanocytów skóry oraz pierwotnego i przerzutowego czerniaka potwierdziły istotne różnice między normalnymi i rakowymi komórkami. Natomiast bardzo istotne jest wykazanie po raz pierwszy, że wykres pomiaru zmiany dyssypacji energii od zmiany częstotliwości rezonansowej może być wykorzystany do różnicowania pierwotnego czerniaka od jego przerzutów w wyniku czułego, selektywnego, szybkiego i stosunkowo niedrogo systemu detekcji.

Przedstawione modele badawcze stanowią podstawę do opracowania innowacyjnych i wydajniejszych technik diagnostyki i prognozyki przebiegu chorób nowotworowych co zostało wykazane na przykładzie pierwotnego czerniaka i jego przerzutów.

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poza pracami opatrzonymi symbolami [H1-H11], jestem współautorem prac dotyczących zastosowania mikroskopii sił atomowych (AFM) do śledzenia procesu tworzenia amalgamatu złota [P1] oraz oceny wpływu atmosfery gazowej na szybkość tworzenia amalgamatu [P7]. Zaprojektowałem przepływowy reaktor gazowy współpracujący z mikroskopami STM i AFM oraz opracowałem metodę badania wolnych zmian morfologii

powierzchni ciał stałych pod wpływem zachodzących na niej reakcji chemicznych [P5]. Zajmowałem się również badaniami morfologii wzrostu cienkich warstw ołowiu na powierzchni niklu [S4] z użyciem spektroskopii elektronów Augera oraz cienkich warstw złota na powierzchni kryształu palladu [P4] z użyciem skaningowej mikroskopii tunelowej. Wiele uwagi poświęciłem optymalizacji metody AFM do charakterystyki szorstkości powierzchni metalicznych [P2-P3, P6, S1-S3] i niemetalicznych [P4]. Jestem współautorem monografii omawiającej otrzymywanie warstw złota o rozwiniętej powierzchni [C1].

Ponadto zająłem się zastosowaniem mikrowagi kwarcowej do badania oddziaływań substancji biologicznych (saponiny) z modelowymi analogami lipidowych błon biologicznych. (dwuwarstwę lipidową zaadsorbowaną na granicy faz ciało stałe/ciecz) [P9, P10].

W następnym etapie zająłem się optymalizacją metody AFM do badania wpływu czynników zewnętrznych na morfologię i właściwości mechaniczne komórek naskórka *in vitro*. Dotyczyło to oceny skuteczności działania substancji zabezpieczających keratynocyty przed szkodliwym wpływem promieniowania UVB [P1] oraz wpływu przeciwstarzeniowych peptydów na właściwości mechaniczne keratynocytów [P11, P13]. Jestem również współautorem dwóch patentów dotyczących opracowania bazy preparatów kosmetycznych.

5. Bibliografia

Afaq F., Syed D.N., Malik A., Hadi N., Sarfaraz S., Kweon M.H., Khan N., Zaid M.A., Mukhtar H., Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis, *Journal of Investigative Dermatology*, 127 (2007) 222.

Alexander M., Bendas G., The Role of Adhesion Receptors in Melanoma Metastasis and Therapeutic Intervention Thereof, "Research on Melanoma - A Glimpse into Current Directions and Future Trends", edited by Mandi Murph, (2011) 394.

Amirpour M.L., Ghosh P, Lackowski W.M, Crooks R.M, Pishko M.V., Mammalian cell cultures on micropatterned surfaces of weak-acid, polyelectrolyte hyperbranched thin films on gold, *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 1560.

Binning G., Quate C.F., Gerber Ch., Atomic force microscope, *Physical Review Letters*, 56 (1986) 930.

Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E., Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *The Journal of Cell Biology*, 106 (1988) 761.

Carrara S., Introduction to Nano-Biosensing, Nano-Bio-Sensing, Springer, (2011).

Ciołczyk-Wierzbicka D., Amoresano A., Casbarra A., Hoja-Łukowicz D., Lityńska A., Laidler P., The structure of the oligosaccharides of N-cadherin from human melanoma cell lines, *Glycoconjugate Journal*, 20 (2004) 483.

Cooper M.A., *Label-Free Biosensors: Techniques and Applications*, Cambridge University Press, (2009).

Choi H., Shin M.K., Ahn H.J., Son Y., Park H.K., Kim K.S., Analysis of micro-inflammation in human keratinocytes by quantitative measurement of mechanical property changes, *Journal of Dermatological Science*, 84 (2016) e136.

Discher D., Dong C., Fredberg J.J., Guilak F., Ingber D., Janmey P., Kamm R. D., Schmid-Schonbein G.W., Weinbaum S., *Biomechanics: cell research and applications for the next decade*, *Annals of Biomedical Engineering*, 37 (2009) 847.

Derynck R., Muthusamy B.P., Saetern K.Y., Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition, *Current Opinion in Cell Biology*, 31 (2014) 56.

Drescher D., Ramakrishnan N., Drescher M., Surface Plasmon Resonance (SPR) Analysis of Binding Interactions of Proteins in Inner-Ear Sensory Epithelia, *Methods in Molecular Biology*, 493 (2009) 323.

Dumoulin M., Ueno H., Hayashi R., Balny C., Contribution of the carbohydrate moiety to conformational stability of the carboxypeptidase Y, *European Journal of Biochemistry*, 262 (1999) 475.

Gallego R., Haseley S., Van Miegem V., Vliegenthart J., Kamerling J., Identification of carbohydrates binding to lectins by using surface plasmon resonance in combination with HPLC profiling, *Glycobiology*, 14 (2004) 373.

Graetzel M., Janssen R.A., Mitzi D.B., Sargent E.H., Materials interface engineering for solution-processed photovoltaics, *Nature*, 488 (2012) 304.

Hashimoto C., Cohen R., Zhang W., Ballou C., Carbohydrate chains on yeast carboxypeptidase Y are phosphorylated, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78 (1981) 2244

Huang S., Ingber D.E., Cell tension, matrix mechanics, and cancer development, *Cancer Cell*, 8 (2005) 175.

Jung J.W., Jo W.H., Annealing-Free High Efficiency and Large Area Polymer Solar Cells Fabricated by a Roller Painting Process, *Advanced Functional Materials*, 20 (2010) 2355.

Kwon J.Y., Lee K.W., Kim J., Jung S.K., Kang N.J., Hwang M.K., Heo Y., Bode A.M., Dong Z., Lee H.J., Delphinidin suppresses ultraviolet B-induced cyclooxygenases-2 expression through inhibition of MAPKK4 and PI-3 kinase, *Carcinogenesis*, 30 (2009) 1932.

Lekka M., Gil D., Pogoda K., Dulińska-Litewka J., Jach R., Gostek J., Klymenko O., Prauzner-Behcicki S., Stachura Z., Wiltowska-Zuber J., Okoń K., Laidler P., Cancer cell detection in tissue sections using AFM, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 518 (2012) 151.

Levental K.R., Yu H., Kass L., Lakins J.N., Egeblad M., Erler J.T., Fong S.F.T., Csiszar K., Giaccia A., Weninger W., Yamauchi M., Gasser D.L., Weaver V.M., Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling, *Cell*, 139 (2009) 891.

Lobb R.J., Lima L.G., Möller A., Exosomes: Key mediators of metastasis and pre-metastatic niche formation, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 67 (2017) 3.

Masaki H., Izutsu Y., Yahagi S., Okano Y., Reactive oxygen species in HaCaT keratinocytes after UVB irradiation are triggered by intracellular Ca(2+) levels, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 14 (2009) 50.

Mocendarbary E., Harris A.R., *Cell mechanics: principles, practices, and prospects*, Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 6 (2014) 371.

Mori T., Ohtsuka T., Okahata Y., Kinetic analyses of bindings of Shiga-like toxin to clustered and dispersed Gb3 glyco-arrays on a quartz-crystal microbalance, *Langmuir*, 26 (2010) 14118.

Morris V.J., Kirby A.R., Gunning A.P., *Atomic force microscopy for biologists*, Imperial College Press (1999).

Nieto M.A., Huang R.Y.J., Jackson R.A., Thiery J.P., EMT: 2016, *Cell*, 166 (2016) 21.

Peiris D., Markiv A., Curley G.P., Dwek M.V., A novel approach to determining the affinity of protein-carbohydrate interactions employing adherent cancer cells grown on a biosensor surface, *Biosensors and Bioelectronics*, 35 (2012) 160.

Reynolds M., Perez S., Thermodynamics and chemical characterization of protein-carbohydrate interactions: The multivalency issue, *Comptes Rendus Chimie*, 14 (2011) 74.

Rosser J.M., Olmos-Calvo I., Schlager M., Purtscher M., Jenner F., Recent Advances of Biologically Inspired 3D Microfluidic Hydrogel Cell Culture Systems, *Journal of Cell Biology and Cell Metabolism* 2 (2015) 5.

Schwarz F., Puri K., Bhat R., Surolia A., Thermodynamics of monosaccharide binding to concanavalin A, pea (*Pisum sativum*) lectin, and lentil (*Lens culinaris*) lectin, *Journal of Biological Chemistry*, 268 (1993) 7668.

Sokolov I., Iyer S., Woodworth C.D., Recovery of elasticity of aged human epithelial cells in vitro, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2 (2006) 31.

Syn N., Wang L., Sethi G., Thiery J.P., Goh B.C., Exosome-Mediated Metastasis: From Epithelial-Mesenchymal Transition to Escape from Immunosurveillance, *Trends in Pharmacological Sciences* 37 (2016) 606.

Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A., Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease, *Cell*, 139 (2009) 871.

van de Sandt J., Roguet R., Cohen C., Esdaile D., Ponc M., Corsini E., Barker C., Fusenig N., Liebsch M., Benford D., de Brugerolle de Fraissinette A., Fartasch M.E., The Use of Human Keratinocytes and Human Skin Models for Predicting Skin Irritation. The Report and Recommendations of European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Workshop 38, *ATLA*, 27 (1999) 723.

Welss T., Basketter D.A., Schröder K.R., In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models, *Toxicology in Vitro*, 18 (2004) 231.

